SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON VIROIDEN IM BLATTGEWEBE VON TOMATENPFLANZEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
JÜRGEN SCHUMACHER
aus Völklingen

Düsseldorf
1984

Subzelluläre Verteilung von Viroiden im Blattgewebe von Tomatenpflanzen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jürgen Schumacher
aus Völklingen

Düsseldorf
1984

1. Berichterstatter:	Prof.Dr.D.Riesner
2. Berichterstatter:	Prof.Dr.R.Herrmann
Tag der Einreichung:	28. Mai 1984
Tag der mündlichen Prüfung:	3. Juli 1984

Meinen Eltern

Mein besonderer Dank gilt Prof.Dr.D.Riesner (Universität Düsseldorf), unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Durch seine stete Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen trug er sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof.Dr.H.L.Sänger (Max-Planck-Institut, Martinsried) bin ich für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial zu Beginn dieser Arbeit sowie für zahlreiche Anregungen beim Aufbau unserer eigenen Pflanzenzucht zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof.Dr.R.Herrmann und Herrn Dipl.Biol.J.Tittgen (Universität Düsseldorf) möchte ich für die Unterstützung bei der Chloroplastenisolierung danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr.M.Colpan, der mir die hochreinen Viroid-Proben zur Verfügung stellte, sowie Herrn Dr.G.Steger (Universität Düsseldorf) für die anregenden Diskussionen über die physikochemischen Eigenschaften von Viroiden und Virusoiden.

Für die Zusammenarbeit beim Projekt "Waldsterben" möchte ich Herrn cand.rer.nat.P.Loss danken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Frau B.Göbel für ihre langjährige technische Assistenz.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Frau Marion für die Reinschrift der vorliegenden Dissertation.

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt und am Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf in der Zeit von Januar 1980 bis Mai 1984 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis
Bezugsquellenverzeichnis

1.	**Einleitung**	1
1.1.	Struktur von Viroiden	2
1.2.	Translation	4
1.3.	Replikation	4
1.4.	Pathogenese	6
1.5.	Lokalisation	7
1.6.	Problemstellung	7
2.	**Methoden**	10
2.1.	Puffer und Chemikalien	10
2.2.	Pflanzenaufzucht	10
2.3.	Präparative Methoden	11
2.3.1.	Nukleinsäureextraktion	11
2.3.2.	Alkalische Hydrolyse von RNA	11
2.3.3.	Isolierung von Zellkernen	12
2.3.4.	Isolierung von Chloroplasten	12
2.3.5.	Fraktionierung der Zellkerne	12
2.3.6.	Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes	13
2.3.7.	Isolierung der Nukleinsäure aus Zellkernen und Chloroplasten	14
2.3.8.	Isolierung der Nukleinsäure aus Tomatengewebe (Schnellmethode)	15
2.3.9.	Isolierung der Nukleinsäure aus Nadeln und Blättern von Fichte, Kiefer, Buche, Tabak und Wein	16
2.4.	Analytische Methoden	16
2.4.1.	Licht-Mikroskopie	16
2.4.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	17
3.	**Methodenentwicklung**	20
3.1.	Entwicklung einer Methode zum Isolieren von Zellkernen	20
3.1.1.	Verwendete Puffer	23
3.1.2.	Identifikation der Zellkerne	24
3.1.3.	Isolierungsmethode	25

3.1.4.	Reinheit und Ertrag	30
3.2.	Entwicklung eines Gelelektrophorese-Verfahrens zum Nachweis von Viroiden in Zellkernen	32
3.2.1.	Eindimensionale Gelelektrophorese	32
3.2.2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	36
3.2.3.	Bidirektionelle Gelelektrophorese	38
4.	**Lokalisierung und Organisation der Viroide im Zellkern**	45
4.1.	Nachweis der Viroide im Zellkern	45
4.2.	Nachweis der Viroide in Chloroplasten und Chromatin	49
4.3.	Nachweis der Viroide in den verschiedenen Zellkern-Komponenten	51
4.4.	Überprüfung der Reinheit der Nukleoli-Fraktion	53
4.4.1.	Mikroskopische Überprüfung der Nukleoli-Fraktion	53
4.4.2.	RNA/DNA Verhältnis der Nukleoli- und der Chromatin/RNP-Fraktion	54
4.5.	Hochsalzlyse der Nukleoli	56
4.6.	Rekonstitutionsversuche von Zellkernen mit Viroiden	57
5.	**Anwendung der zweidimensionalen Elektrophorese auf das Problem des "Waldsterbens"**	61
5.1.	Einleitung	61
5.2.	Probenaufbereitung	62
5.3.	Keine Hinweise auf Viroide in erkrankten Bäumen	64
5.4.	Krankheitsassoziierte RNAs	66
5.4.1.	Nukleinsäuremuster von Kiefern	66
5.4.2.	Nukleinsäuremuster von Fichten	67
5.4.3.	Nukleinsäuremuster von Buchen	68
6.	**Diskussion**	70
6.1.	Entwicklung eines neuen Gelelektrophoreseverfahrens	70
6.2.	Verteilung der Viroide in den Pflanzenzellen	73
6.3.	Viroide sind mit der Nukleoli-Fraktion assoziiert	76
6.4.	Funktionshypothese von Viroiden	78
6.4.1.	Infektionsmechanismus	78
6.4.2.	Replikation	78
6.4.3.	Pathogenese der Viroide	80
6.4.4.	Ursprung der Viroide	81

6.5. Anwendungen der zweidimensionalen Gelelektrophorese 81

7. **Zusammenfassung** 83

8. **Literaturverzeichnis** 85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Å	Ångström
A_{260}	Absorption bei 260 nm
$AgNO_3$	Silbernitrat
ASBV	Avocado sun blotch viroid
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
CEV	Citrus exocortis viroid
cDNA	copy DNA
Cl^--Ionen	Chlorid-Ionen
Cs_2SO_4	Cäsiumsulfat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
c-Viroid	zirkuläres Viroid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanosin
g	Gramm
h	Stunde
HCHO	Formaldehyd
HCl	Salzsäure
HMG	high-mobility group
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
l-Viroid	lineares Viroid
M	Molar
m	milli (10^{-3})
MES	Morpholinethansulfonsäure
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
n	nano (10^{-9})

$NaBH_4$	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxyd
$(NH_4)_2S_2O_8$	Ammoniumperoxodisulfat
nm	10^{-9} Meter
NP 40	Nonidet P 40
p	pico (10^{-12})
PSTV	Potato spindle tuber viroid
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg-Einheit (10^{-13} s)
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	small nuclear RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
T_M	Übergangstemperatur
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
tRNA	Transferribonukleinsäure
U	Uracil
V	Volt

Bezugsquellenverzeichnis

Acrylamid	BRL, Neu-Isenburg
$AgNO_3$	Merck, Darmstadt
BSA	Serva, Heidelberg
Bentonit	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carborundum	Butzbacher Schleifmittelwerke, Butzbach
Cs_2SO_4	Baker, Groß-Gerau
CTAB	Merck, Darmstadt
DNase I	Worthington, Meckenheim
DTE	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
LiCl	Baker, Groß-Gerau
Mannit	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MES	Sigma, München
Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
$NaBH_4$	Riedel de Haen, Seelze
$(NH_4)_2SO_4$	Merck, Darmstadt
NP 40	BRL, Neu-Isenburg
Phenol	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Saccharose, RNase-frei	BRL, Neu-Isenburg
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	BioRad, München
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

1. Einleitung

Viroide sind die kleinsten natürlichen Krankheitserreger. Mit einer Länge von etwa 400 Å, einem Durchmesser von 25 Å und einem Molekulargewicht von 120 000 im Falle von PSTV (potato spindle tuber viroid) sind sie etwa 25mal kleiner als die kleinsten Bakteriophagen. Sie bestehen aus einzelsträngiger, ringförmiger Ribonukleinsäure (RNA) mit einer Kettenlänge von 240-380 Nukleotiden je nach Viroid- Spezies. Im Gegensatz zu Viren besitzen sie keine Proteinhülle. Viroide wurden bisher ausschließlich bei höheren Kultur- und Zierpflanzen gefunden, bei denen sie eine Reihe von wirtschaftlich schwerwiegenden Krankheiten verursachen. So führt das cadang-cadang Viroid auf den Philippinen zu katastrophalen Schäden (Abb. 1). Hier sterben zur Zeit 500 000 Palmen pro Jahr an dieser Krankheit (Zelasny et al., 1982). Der derzeitige Kenntnisstand über Viroide ist in einer Reihe von Übersichtsartikeln detailliert beschrieben (Randles, 1975; Diener, 1979a; Diener 1979b; Gross und Riesner, 1980; Sänger, 1982).

Abb. 1: Vom cadang-cadang Viroid befallene Kokospalmenplantage auf den Philippinen

1.1. Struktur von Viroiden

Grundvoraussetzung für quantitative molekulare Untersuchungen zur Struktur der Viroide war die Verfügbarkeit größerer Mengen einheitlichen Viroidmaterials. Es war in diesem Zusammenhang hilfreich, daß einige dieser Viroid-RNAs auf die schnellwachsende Tomate übertragen werden konnten. Abb. 2 zeigt an etwa 6 Wochen alten Pflanzen das für die Infektion typische Einrollen der Blätter und die allgemeine Wachstumsstagnation.

Abb. 2: Mit PSTV infizierte Tomatenpflanze (links), gesunde Kontrollpflanze (rechts)

Die Isolierung der für die Infektion verantwortlichen RNA aus den Pflanzen war lange Zeit sehr mühevoll. So betrug die Ausbeute einer sich über Wochen hinziehenden Folge verschiedener Fraktionierungs- und Elektrophoreseschritte aus 1 kg Blattgewebe (≙200-500 Pflanzen) nur wenige µg Viroid

(Mühlbach und Sänger, 1977). Das lag einerseits an dem geringen Viroidgehalt im Blattgewebe, zum anderen an dem hohen Anteil an Polysacchariden, Polyphenolen und anderen sekundären Pflanzenstoffen, die eine Nukleinsäurereextraktion erschweren und lange Zeit nur verlustreiche Isolierungsmethoden zuließen (Semancik und Weathers, 1972; Semancik et al., 1975; Sänger et al., 1976; Randles et al., 1976; Diener und Hadidi, 1977; Mühlbach und Sänger, 1977; Morris und Smith, 1979; Diener, 1979b; Dickson, 1979; Palukaitis und Symons, 1980; Pfannenstiel et al., 1980; Branch et al.,1980; Niblett et al., 1980; Ohno et al., 1982; Granell et al., 1983; Semancik und Szychowski, 1983). Erst in jüngster Zeit gelang es, durch Kombination von Cs_2SO_4-Dichtezentrifugation und HPLC-Chromatographie in 3-4 Tagen aus 1 kg Blattgewebe praktisch verlustfrei 1 mg Viroid zu isolieren (Colpan et al., 1983).

Nach der ersten gelungenen Aufreinigung der Viroide (etwa 1975) stand die Aufklärung ihrer Struktur im Vordergrund. Die physikochemischen Untersuchungen (Henco et al., 1977; Riesner et al., 1979) und die Sequenzanalyse (Gross et al., 1978) von PSTV zeigten, daß der kovalent geschlossene Nukleotidstrang der Viroid-RNA durch intramolekulare Basenpaarung eine stäbchenförmige Struktur bildet. In ihr wechseln sich kurze Doppelhelices mit kleinen ungepaarten Bereichen ab (Abb. 3). Die Kooperativität der thermi-

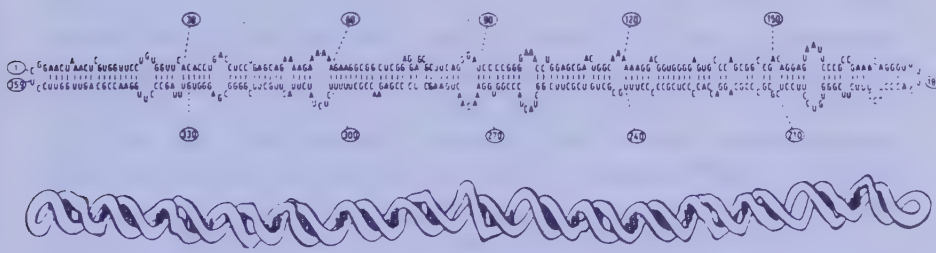

Abb. 3: Strukturmodell des Viroids am Beispiel des PSTV
Oben: Basenpaarungsschema; unten: dreidimensionale Darstellung
(Gross und Riesner, 1980)

schen Denaturierung zeigt Ähnlichkeiten zu doppelsträngigen Nukleinsäuren, die Übergangstemperatur T_M dagegen ist charakteristisch für einzelsträngige RNAs. Eine zusätzliche Tertiärstruktur konnte durch Liganden-Bindungsexperimente mit Farbstoffen (Rokohl, 1982) und spezifischen tRNAs (Wild et al.,

1980, Kratz, 1981) ausgeschlossen werden. Mittlerweile sind die meisten bekannten Viroide sequenziert, und allen scheint dieses Strukturmodell zugrunde zu liegen (Sänger, 1982; Riesner et al., 1983).

1.2. Translation

Recht wenig dagegen weiß man über den aktuellen strukturellen Zustand der Viroid-RNA innerhalb der Zelle sowie die molekularen Grundlagen von Replikation und Pathogenese. Wie gelingt es dem Viroid trotz seiner geringen Größe, den Metabolismus der Wirtspflanze so entscheidend zu beeinflussen, wie das die Abbildungen 1 und 2 zeigen? Es lag nahe, zunächst nach dem genetischen Informationsgehalt der Viroid-RNA zu fragen.

Die zirkuläre Anordnung der 359 Basen des PSTV, des bisher am besten untersuchten Viroids, machen drei Translationsrunden theoretisch möglich. Aber das Fehlen eines Initiationscodons AUG, einer Ribosomenbindestelle am 5'-Ende des möglichen GUG Startcodons und einer Capstruktur sowie die sehr stabile Sekundärstruktur machen die Übersetzung des Viroids in Peptide oder Proteine sehr unwahrscheinlich (Gross et al, 1978). Auch bei dem sogenannten minus-Strang Viroid, das in der Zelle bei der Transkription der plus-Stränge in RNA anfällt (Branch et al., 1978; Rohde und Sänger, 1981; Owens und Diener, 1982), ist die Situation ähnlich. Zwar lassen sich vier mögliche Proteine mit 28, 43, 79 oder 108 Aminosäuren formulieren, bisher konnte aber keines in infizierten Pflanzen nachgewiesen werden. Was aus krankem Gewebe isoliert werden kann, ist ein Protein vom Molekulargewicht 14 000, das in gesunden jungen Pflanzen fehlt (Camacho und Sänger, 1982a,b). Dieses ist aber nicht viroidspezifisch und kann sowohl nach Virus- oder Pilzbefall als auch bei alten oder gestreßten Pflanzen gefunden werden.

Translationsexperimente, die versuchten, PSTV und CEV (citrus exocortis viroid) in vitro in Proteine zu übersetzen, schlugen fehl. Viroid interferiert auch nicht mit der Translation von mRNA in solchen Systemen (Davies et al., 1974; Hall et al., 1974; Semancik et al., 1977).

1.3. Replikation

Wie erfolgt dann aber die Vermehrung der Viroide, wenn sie selbst für

eine Replikase nicht codieren können und als nackte infektiöse RNA auch keine eigene Replikase in die Zelle einschleusen, wie das viele Viren tun? Was nicht ausgeschlossen werden kann, ist die Übersetzung eines Teils der Viroid-RNA in ein kleines Peptid, das die zelleigene Nukleinsäuresynthesemaschinerie in eine viroid-spezifische Replikase verwandelt. Ansonsten werden für die Replikation der Viroide drei Möglichkeiten diskutiert:

1) Die Viroid-RNA wird durch eine reverse Transkriptase in DNA übersetzt, die den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen als Template dient. Allerdings wurde bisher weder in gesunden noch in kranken Pflanzen eine reverse Transkriptase entdeckt, und viroid-spezifische DNA im Genom konnte mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden (Branch und Dickson, 1980; Zaitlin et al., 1980; Branch et al., 1981; Hadidi et al., 1981; Rohde und Sänger, 1981).
2) Viroide werden über eine komplementäre RNA, wie man es von den RNA-Pflanzenviren kennt, repliziert, wobei die RNA-abhängige RNA-Polymerase der Wirtspflanzen benutzt werden könnte. Inzwischen wurde auch gezeigt, daß eine Fraktion aus gesunden Tomatenpflanzen mit dieser Enzymaktivität in vitro komplementäre Viroidsequenzen bis hin zur vollen Viroid-Länge synthetisiert (Boege et al., 1982). Zu überprüfen wäre hierbei allerdings, ob diese Aktivität nicht durch Spuren z.B. von DNA-abhängiger RNA-Polymerase vorgetäuscht wird.
3) Aufgrund der DNA Ähnlichkeit der Viroide könnten sie auch effektive Templates für die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen sein.

An Protoplasten und Zellkulturen aus Tomaten-Blattgewebe sowie einem zellfreien System aus Gynura konnte mit Hilfe von α-Amanitin, einem Pilzgift, das unterschiedlich auf die verschiedenen Polymerasen wirkt, gezeigt werden, daß DNA-abhängige RNA-Polymerase II an der Viroid-Replikation direkt oder indirekt beteiligt ist (Mühlbach und Sänger, 1979; Flores und Semancik, 1982). Das Antibiotikum Actinomycin D sowie Cycloheximid wirkten beide unspezifisch und ließen keine eindeutigen Schlüsse zu.

Im folgenden konnte gezeigt werden, daß auch in vitro die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, die dazu aus Tomatencallus, grünem Blattgewebe und Weizenkeimen isoliert worden war, nicht nur Viroid in voller Länge transkribiert, sondern daß Viroid sogar unter den getesteten natürlichen RNAs (TMV-RNA, 5S RNA, tRNA) das effektivste Template darstellt (Rackwitz et al., 1981). Während in vitro allerdings die Polymerase nach einem Umlauf der Viroid-Transkription stoppt, findet man in vivo plus-Strang (Haseloff et al., 1982) und minus-Strang Viroidmultimere (Rohde und Sänger, 1981; Branch

et al., 1981; Owens und Diener, 1982).

Diese durch Hybridisierung gefundenen Vielfachen lassen vermuten, daß die Viroid-Replikation, mit welchem Enzym sie auch erfolgen mag, entsprechend einem "rolling circle" Mechanismus abläuft (Branch et al., 1981; Owens und Diener, 1982; Branch und Robertson, 1984), der für die Vermehrung einiger viraler RNAs vorgeschlagen wurde (Brown und Martin, 1965).

1.4. Pathogenese

Da alle Ergebnisse dafür sprechen, daß Viroid-RNA nicht für irgendein Protein codiert und die Replikation über die Wirtszellmaschinerie abläuft, beruht die Wirkung der Viroide auf die Pflanze wohl auf einer direkten Wechselwirkung der RNA mit dem Nukleinsäure-Metabolismus der Zelle. Wie bereits erwähnt, könnte die Inanspruchnahme der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II für die Viroid-Vermehrung pathogen wirken. Als zweite Möglichkeit wurde von mehreren Autoren diskutiert, daß es sich bei den Viroiden um verselbständigte regulatorische RNAs handelt. Unterstützt wurde diese These noch dadurch, daß eine hohe Sequenzhomologie zwischen U1 RNA, die eine Rolle beim Prozessieren der eukaryotischen mRNAs spielen soll (Lerner et al.,1980), und einem Bereich im Viroid, der in vielen Viroid-Spezies konstant vorhanden ist, gefunden wurde (Diener, 1981a,b; Dickson, 1981; Diener, 1982; Gross et al., 1982). Damit wäre es möglich, daß minus-Strang Viroide, die während der Viroid-Replikation auftreten, mit der U1 RNA basenpaaren könnten. Aufgrund der postulierten Wechselwirkung der U1 RNA mit den mRNAs könnte damit zusätzlich plus-Strang Viroid mit mRNA basenpaaren (Randles et al., 1982; Riesner et al., 1983). Diese Wechselwirkung zwischen Viroiden einerseits und mRNA Synthese und Prozessierung andererseits könnte für einen pathogenen Effekt verantwortlich sein.

Die Unterschiede in der Ausprägung der Krankheit, die von nicht sichtbar geschädigt bis letal reichen, könnten in Sequenzunterschieden der Viroid-RNA liegen, die wiederum zu Affinitätsunterschieden zwischen Viroid und mRNA, U1 RNA oder Polymerase führen würden. Die Annahme einer U1 RNA-Viroid- Wechselwirkung hat allerdings mehrere Schwachstellen:

1) Bisher konnte U1 RNA aus Pflanzen noch nicht isoliert werden. Allerdings sind alle bekannten U1 RNAs in ihrer Sequenz sehr konservativ (Bralant et al., 1980).
2) Es gibt Viroide, die keine zu U1 RNA komplementäre Sequenz aufweisen.

3) Die Beteiligung von U1 im "Splicing"-Prozeß selbst ist noch umstritten (Trapnell et al., 1980; Sharp, 1981; Zieve, 1981).

Daß der Mechanismus der Pathogenität komplexer ist als es zunächst den Anschein hat, mag auch dadurch veranschaulicht werden, daß nicht nur verschiedene PSTV Stämme hinsichtlich der Stärke der Krankheitssymptome existieren, sondern daß die verschiedenen Handelssorten der Tomate auf ein und dasselbe PSTV-Isolat total unterschiedlich reagieren.

1.5. Lokalisation

Bei all diesen Vermutungen wurde stillschweigend angenommen, daß das Viroid im Zellkern lokalisiert ist, wenigstens bei der Replikation und dem pathogenen Einfluß auf die Pflanzen. Dort nämlich befinden sich auch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II und die U1 RNA. In der Vergangenheit wurde auch mehrmals berichtet, daß Viroide offensichtlich mit dem Zellkern assoziiert sind (Diener, 1971; Sänger, 1972; Takahashi und Diener, 1975; Semancik et al., 1976). Diese Aussagen stützten sich allerdings immer nur auf angereicherte Zellkernfraktionen, verunreinigt mit Stärke, Zellbruchstücken, Membranresten und Chloroplasten-Fragmenten. Nie ganz auszuschließen war damit die Möglichkeit, daß sich Viroide z.B. innerhalb der Zelle in den Chloroplasten befinden und deren genetischen Apparat zur Vermehrung benutzen.

1.6. Problemstellung

Nachdem sich unser Arbeitskreis bisher hauptsächlich mit *in vitro* Strukturuntersuchungen am Viroid befaßt hatte, lag es nahe, diese Forschungen auch auf *in vivo* Probleme auszuweiten. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Frage nach der Lokalisierung der Viroide innerhalb der Zelle. Die Belege für eine Assoziation der Viroid-RNA mit dem Zellkern in den oben zitierten Arbeiten schienen uns nicht beweiskräftig genug, um darauf ein längerfristiges Arbeitsprogramm aufzubauen. Sollte sich nämlich herausstellen, daß die Viroide dort nicht lokalisiert sind, so wären alle Überlegungen zur Wechselwirkung mit Zellkernmolekülen, also der Polymerase oder den snRNAs, inhaltslos.

Eines der Hauptziele und, wie sich zeigen sollte, auch eine der Haupt-

schwierigkeiten dieser Arbeit bestand also darin, Zellkerne zu isolieren, und zwar aus grünem Gewebe und vor allem in hochreiner Form. Leider konnte hierbei auf keine etablierte Methode zurückgegriffen werden. Zum einen sind die Veröffentlichungen auf diesem Gebiet ohnehin recht rar, zum anderen wurde oft von den Autoren für die Kernisolierung das Pflanzenmaterial ausgesucht, das die wenigsten Probleme bereitete: möglichst wenig grünes Gewebe, möglichst junges Gewebe mit wenig Vakuolen, möglichst wenig Stärke und möglichst keine Zellwände (Kuehl, 1964; D'Alessio und Trim, 1968; Tautvydas, 1971; Hamilton et al., 1972; Blaschek et al., 1974; Chen et al., 1975; Capesius und Meyer, 1977; Mennes et al., 1977; Lörz und Potrykus, 1978; Luthe und Quatrano, 1980; Willmitzer und Wagner, 1981). In der vorliegenden Arbeit dagegen waren die Tomatenpflanzen vorgegeben und die Isolierung mußte daraufhin adaptiert werden.

Eine weitere sehr wesentliche Frage zielt auf die in vivo Konzentration der Viroide innerhalb der Zelle ab. Sollte sich dabei ergeben, daß die Kopienzahl an Viroid-RNA z.B. 10 beträgt, die Polymerase II bekanntermaßen aber mit 10^5, die U1 RNA mit 10^6 Kopien pro Zelle vorliegt, so sind die oben angeführten Hypothesen zur Replikation nur schwer zu verstehen.

Um solche quantitativen Aussagen machen zu können, ist sicherlich der Bioassay eine unbefriedigende Methode. Hierbei werden gesunde Pflanzen, die unter für das Viroid optimalen Wachstumsbedingungen gehalten werden, mit der zu untersuchenden Fraktion inokuliert. Die Ergebnisse, die hierbei nach 4-6 Wochen erhalten werden, können nur qualitativ eine Entscheidung erlauben, ob überhaupt Viroid in der entsprechenden Fraktion vorhanden war. Eine bessere Methode wäre die der Gelelektrophorese. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, ob, ausgehend von 100 g Blättern und einer geschätzten Ausbeute an Zellkernen von z.B. 1%, überhaupt Viroide, selbst bei einer sehr hohen Kopienzahl, nachweisbar sind. Sicherlich genügen die in der Vergangenheit benutzten Färbemethoden diesen Ansprüchen nicht.

Die Methode, die sich heute für derartige Probleme anbietet, ist die der Hybridisierung. Hierbei werden mit radioaktiv markierter cDNA gezielt die Moleküle in der zu überprüfenden Probe gesucht, zu denen die cDNA komplementär ist. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode ist sehr hoch. Sie beträgt, je nach der Stärke der radioaktiven Markierung, wenige pg. Zu Beginn dieser Arbeit waren allerdings Viroide noch nicht kloniert und es standen uns damit auch keine cDNAs zur Verfügung.

Sollte sich tatsächlich zeigen lassen, daß die Viroide im Zellkern lokalisiert sind, so stellt sich sofort die Frage, wo sie dort nachzuweisen

sind. Recht einfach zugängliche Fraktionen sind das Chromatin, die Ribonukleoproteinpartikel (RNP) und die Nukleoli. Sollte die Hypothese der Wechselwirkung der Viroide mit der U1 RNA und den mRNAs zutreffen, so müßten die Viroide in den RNPs nachzuweisen sein. Andererseits ist von der Polymerase II bekannt, daß sie zum Teil mit dem Chromatin assoziiert ist. Bei einer Viroid-Polymerase-Wechselwirkung sollten die Viroide also im Chromatin angereichert sein.

Ist die Lokalisierung der Viroide erst einmal soweit geklärt, so sollte es kein sehr großes Problem mehr darstellen, die wechselwirkenden Moleküle nach Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren zu klassifizieren. So ist z.B. bekannt, daß mit steigender Ionenstärke Protein-Nukleinsäure-Komplexe immer labiler werden, Nukleinsäure-Nukleinsäure-Komplexe in diesem Fall dagegen immer stabiler. Kann man Viroid aber mit Detergentien aus seinem Komplex herauslösen, so spricht das für eine Lipid-Nukleinsäure-Wechselwirkung.

Aus dem bisher Gesagten sollte schon deutlich geworden sein, wie eng die Fragen der Lokalisation und Konzentration der Viroide innerhalb des lebenden Systems Zelle mit der Frage nach ihren Funktionen verzahnt sind. Sollten die Viroide z.B. in den Chloroplasten zu finden sein - eine gar nicht so abwegige Vermutung, da sie bisher nur in Pflanzen nachgewiesen werden konnten - ,so müssen andere wechselwirkenden Moleküle diskutiert werden, als wenn sie im Zellkern aufgespürt würden. Gelänge es zudem, diese assoziierten Moleküle näher zu charakterisieren, z.B. nach Nukleinsäuren oder Proteinen, so hätte man über die in vivo Struktur der Viroide tatsächlich einen Schlüssel zu ihrer Funktion in der Hand.

2. Methoden

Viele der besprochenen Methoden sind erst im Laufe der vorliegenden Arbeit entwickelt worden. Sie sind damit Teil der Ergebnisse und werden dort ausführlich diskutiert. An dieser Stelle sind Standardmethoden aufgeführt, die z.T. unverändert übernommen, z.T. leicht modifiziert wurden.

2.1. Puffer und Chemikalien

Die Puffer wurden ausnahmslos mit hochreinem Milli-Q Wasser (Millipore GmbH, Neu-Isenburg), das im folgenden als H_2O bezeichnet wird, und, soweit käuflich erhältlich, mit p.a.-Chemikalien angesetzt. Die RNase freie Saccharose stammte von BRL (Bethesda, Neu-Isenburg) ebenso das Acrylamid. Das Gradientenmaterial Percoll wurde von Pharmacia bezogen, das Bisacrylamid von BioRad (München). Die Enzyme DNase I und Proteinase K wurden von Worthington (Meckenheim) bzw. Merck (Darmstadt) geliefert. Falls möglich, wurden die Lösungen 25 min bei 125°C autoklaviert oder über 1.2 µm Membranfilter (GSVP, Millipore GmbH, Neu-Isenburg) filtriert. Das für die Nukleinsäureextraktion benutzte Phenol war mit 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 gesättigt (Maniatis et al., 1982).

2.2. Pflanzenaufzucht

An Pflanzen wurden nur Tomaten (Lycopersicon esculentum) der Handelssorte Rutgers benutzt. Sie wurden im Winter ausschließlich unter Kunstlicht in einem Rhythmus von 18 h Tag und 6 h Nacht aufgezogen (Philips 2x HPI-T 400 W, 1x SON-T 400 W, 4x TLD 58 W/82 für einen Raum von 10 m^2). Die Lichtintensität betrug 6000 Lux, die relative Luftfeuchtigkeit überstieg nicht 40%). Im Sommer wuchsen die Pflanzen in einem Gewächshaus ohne Zusatzbeleuchtung. Eine Heizung sorgte dafür, daß die Temperaturen nachts nicht unter 15°C absanken.

Die Blätter der zur Infektion bestimmten Pflanzen wurden eine Woche nach dem Pikieren entweder direkt mit isoliertem PSTV oder mit einem Rohextrakt infizierter Blätter inokuliert. Das Viroid wurde ursprünglich von T.O. Diener (Beltsville, Maryland, USA) erhalten. Zum Erhalten des Rohex-

traktes wurden 2 g Symptom tragende Blätter in einem eiskalten Mörser in 1 ml einer 2% igen K_2HPO_4-Lösung mit 1% igem Bentonit und einer Spatelspitze Seesand homogenisiert. Die Infektion erfolgte durch Auftropfen des Inokulums auf mit 350 mesh Carborundum bestäubte Blätter und Einreiben des Tropfens mit einem Glasspatel. Anschließend wurden die Blätter gründlich mit Wasser abgespült (Singh und Sänger, 1976).

Die Pflanzen zeigten 14 Tage nach der Inokulation die ersten Symptome. Etwa 6-8 Wochen nach der Aussaat wurde das gesunde bzw. kranke Pflanzenmaterial - Blätter, Stengel oder Wurzeln - entweder direkt weiterverarbeitet oder in flüssiger Luft schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.3. Präparative Methoden

2.3.1. Nukleinsäureextraktion

Die aufzureinigenden Lösungen, die nach verschiedenen Aufschlußmethoden gewonnen wurden (siehe aufgeschlossene Zellkerne und Chloroplasten, Nukleoli, RNPs, die verschiedenen Pflanzenhomogenate), wurden auf 2% SDS eingestellt und die Nukleinsäure mit Puffer-gesättigtem Phenol und Chloroform extrahiert (Maniatis et al., 1982). Die wäßrige Phase wurde mit NaOAc auf 300 mM Salz eingestellt und die Nukleinsäure durch Zugabe der dreifachen Menge an absolutem Ethanol bei -70°C für 1 h gefällt. Die abzentrifugierte Nukleinsäure wurde zweimal mit 70%igem Ethanol, das 200 mM NaOAc enthielt, gewaschen und kurz im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur weiteren Benutzung wurde das Sediment entweder in einem entsprechenden Puffer oder in H_2O gelöst oder bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Alkalische Hydrolyse von RNA

Hierzu wurden die zu hydrolysierenden Nukleinsäureproben 1:10 mit H_2O verdünnt und auf 0.7 M KOH eingestellt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 60°C wurde die Lösung mit HCL neutralisiert und durch Zugabe der dreifachen Menge an absolutem Ethanol die Nukleinsäure gefällt. Zur weiteren Behandlung siehe 2.3.1..

2.3.3. Isolierung von Zellkernen

Die Ausarbeitung zur Isolierung von Zellkernen aus grünen Tomatenblättern stellt einen wesentlichen Teil der vorliegenden Arbeit dar und wird unter **Methodenentwicklung** diskutiert.

2.3.4. Isolierung von Chloroplasten

Die Chloroplasten wurden nach einer Vorschrift von Herrmann isoliert (1982). Das im Waring Blendor aufgeschlossene Blattgewebe wurde filtriert und die Chloroplasten über Differential-Zentrifugation angereichert. Die Hochreinigung erfolgte über einen linearen Saccharose-Gradienten. Hierbei bandierten die Chloroplasten, wohingegen Kernfragmente, verklumpte Organell-Reste, Stärkekörner und Membranteile im Sediment zu finden waren.

2.3.5. Fraktionierung der Zellkerne

Zur Fraktionierung der Tomaten-Zellkerne in Chromatin/RNP und Nukleoli wurde die von Pederson (1974) für Rattenleber-Zellkerne beschriebene Methode wie folgt modifiziert.

Verwendete Puffer:

Puffer E:	25	mM MES/NaOH, pH 6.5
	10	mM KCl
	5	mM $MgCl_2$
	0.1	% BSA
	1	mM DTE
	250	mM Mannit
Puffer RSB:	10	mM NaCl
	1.5	mM $MgCl_2$
	10	mM Tris-HCl, pH 7.0

Puffer RSB*:	10 mM NaCl
	1.5 mM $MgCl_2$
	10 mM Tris-HCl, pH 7.0
	30 % Saccharose (w/v)

Puffer 1:	100 mM Tris-HCl, pH 7.5
	10 mM EDTA
	100 mM NaCl

10^8 Zellkerne wurden in 1 ml Puffer E suspendiert, zu 9 ml RSB Puffer gegeben und durch dreimal 10 s Ultraschall-Behandlung bei 45 W (Braun Labsonic 1510 mit Standardkopf) auf Eis aufgebrochen. Stellte sich beim Mikroskopieren heraus, daß weniger als 95 % der Zellkerne zerstört waren, wurde erneut für 10 s beschallt. Anschließend wurde die Probe auf 25 ml Puffer RSB* geschichtet und bei 5000 rpm für 15 min im SW 28 Ausschwingrotor (Beckman) bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden vier Fraktionen geerntet:

1) das in 1 ml Puffer 1 aufgenommene Sediment
2) das untere Drittel des Saccharose-Kissens
3) die oberen zwei Drittel des Saccharose-Kissens
4) die Grenzschicht zum Kissen hin mit der darüber befindlichen Lösung.

Die Fraktionen wurden zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.3.6. Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes

a) der Nukleoli-Fraktion

Puffer 2:	10 mM Tris-HCl, pH 7.5
	15 mM $MgCl_2$
	500 mM NaCl

Puffer 3:	10 mM Tris-HCl, pH 7.5
	20 mM EDTA
	100 mM NaCl
	2 % SDS

Die sedimentierten Nukleoli wurden in Puffer 2 für 5 min heftig geschüttelt (1 ml auf $1 \cdot 10^8$ Nukleoli). Diese Suspension wurde 1:1 mit Puffer 3 verdünnt und 3 mg Proteinase K zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 38°C wurde die Lösung phenolextrahiert und die Nukleinsäure gefällt (siehe 2.3.1.). Die getrockneten Sedimente wurden in Cs_2SO_4-Lösungen der Dichten 1.4 für die DNA-Messung und 1.61 für die RNA-Messung in einer Konzentration von 0.1 A_{260}/ml aufgenommen. Unlösliche Partikel wurden absedimentiert (5000 rpm, 15 min, 4°C). Die Überstände wurden in Kunststoffdoppelsektorzellen in einem Titan 4-Loch-Rotor in der analytischen Ultrazentrifuge (Model E, Beckman) bei 20°C und 44 000 rpm für 24 h zur Ausbildung eines Dichtegradienten zentrifugiert. Der RNA/DNA-Gehalt wurde über das Verhältnis der Peakflächen der jeweiligen Proben im Gradienten durch UV-Absorptionsmessung bei 292 nm bestimmt.

b) der RNP/Chromatin-Fraktion

Puffer 1: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
10 mM EDTA
100 mM NaCl

Die entsprechende Fraktion wurde aufgetaut und mit 3 mg Proteinase K für 2 h bei 38°C verdaut. Durch Zugabe der dreifachen Menge an Ethanol wurden die Peptide und Nukleinsäuren gefällt. Die Sedimente wurden zweimal mit 70% igem Ethanol, das 200 mM NaOAc enthielt, gewaschen, getrocknet und in Puffer 1 gelöst. Ungelöste Partikel wurden kurz abzentrifugiert und der Überstand phenolisiert. Die Nukleinsäure wurde gefällt (siehe 2.3.1.) und, wie unter a) beschrieben, der relative Gehalt an RNA und DNA bestimmt.

2.3.7. Isolierung der Nukleinsäure aus Zellkernen und Chloroplasten

Puffer 4: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
15 mM $MgCl_2$
500 mM NaCl

Puffer 5: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
20 mM EDTA
100 mM NaCl
2 % SDS

Vanadyl-Stammlösung: 200 mM Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex

Der Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex inhibiert sehr effektiv Ribonukleasen, indem er als kompetitiver Inhibitor mit sehr hoher Bindekonstante fungiert. Er wurde nach der Methode von Berger und Birkenmeier (1979) hergestellt.

2 ml Puffer 4 wurden mit 200 µl Vanadyl-Stammlösung und 1000 units DNase bei 4°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden in dieser Lösung die isolierten sedimentierten Zellkerne durch kräftiges Schütteln für 2 min lysiert und bei 38°C für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Puffer 5 und 3 mg Proteinase K wurde 2 h bei 38°C inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile kurz abzentrifugiert (5000 rpm, 15 min, 4°C), der Überstand auf 100 mM EDTA zur Zerstörung des Vanadyl-Ribonukleosid-Komplexes eingestellt, die Nukleinsäure phenolextrahiert und anschließend gefällt (siehe 2.3.1.).

2.3.8. Isolierung der Nukleinsäure aus Tomatengewebe (Schnellmethode)

Puffer 1: 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
10 mM EDTA
100 mM NaCl

1 g Blatt-, Wurzel- oder Stengelgewebe, frisch oder tiefgefroren, wurde in 2.5 ml Puffer 1 und 2.5 ml Puffer-gesättigtem Phenol aufgenommen und im Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf 2% SDS (bezogen auf die wäßrige Phase) eingestellt, kräftig geschüttelt und durch Miracloth (Calbiochem-Behring, Giessen) gefiltert. Röhrchen und Filter wurden mit 2.5 ml Chloroform nachgespült und aus der wäßrigen Phase die Nukleinsäure extrahiert (siehe 2.3.1.). Die gefällte und getrocknete Nukleinsäure wurde in 500 µl H_2O gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

2.3.9. Isolierung der Nukleinsäure aus Nadeln und Blättern von Fichte, Kiefer, Buche, Tabak und Wein

Puffer 6: 100 mM Tris-HCl, pH 8.5
10 mM EDTA
100 mM NaCl
50 mM Mercaptoethanol

5 g in flüssiger Luft schockgefrorene und bei -70°C gelagerte Nadeln oder Blätter wurden zweimal kurz mit Aceton gewaschen, anschließend viermal mit H_2O abgespült und mit 15 ml Puffer 6 am Ölpumpenvakuum infiltriert. Nach Zugabe von 15 ml Puffer-gesättigtem Phenol wurde noch zweimal evakuiert, 0.3 g SDS zugegeben und das Gewebe im Ultra Turrax aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde durch Miracloth gefiltert und Röhrchen und Filter mit 15 ml Chloroform nachgespült. Aus der wäßrigen Phase wurde die Nukleinsäure extrahiert, gefällt, getrocknet und in 1 ml H_2O gelöst (siehe 2.3.1.). Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

2.4. Analytische Methoden

2.4.1. Licht-Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Zeiss Photomikroskop III mit Fluoreszenz-Auflicht und Phasenkontrast-Durchlicht Einrichtung durchgeführt. Für die Zellkernbeobachtung erfolgte die Fluoreszenzanregung durch ein Zeiss FI 546 Transmissions-Filter zusammen mit einem FI 580 Reflexions-Filter. Die Emission wurde durch ein Zeiss 58 Sperrfilter beobachtet. Für die Untersuchung der Chloroplasten wurde der Erregerfilter KP 500, der Reflektor FI 500 und der Sperrfilter 53 benutzt. Gefärbt wurden die Proben durch eine 1:1 Verdünnung mit einer Lösung, die 10 µg/ml Ethidiumbromid in H_2O enthielt. Bei der Anregung bei 546 nm leuchteten die Kerne rot, die Chloroplasten waren nur sehr schwer zu erkennen, bei 500 nm fluoreszierten die Kerne hellgelb und die Chloroplasten leuchtend rot. Die Zellkerne bzw. Chloroplasten wurden in einer Zählkammer nach Thoma ausgezählt.

Die Nukleoli zeigten keine Fluoreszenz nach Ethidiumbromid-Färbung. Sie wurden unter Phasenkontrast beobachtet und ebenfalls in der Thoma-Kammer ausgezählt.

2.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Nukleinsäuren wurden auf 5% Acrylamid Plattengelen (14 x 10 x 0.15 cm) in Tris-Borat Puffer aufgetrennt (Peacock und Dingmann, 1968).

Lösung A:
75 g Acrylamid (=30% Acrylamid)
1.75 g N, N'-Methylen-Bisacrylamid
ad 250 ml mit H_2O

Lösung B:
890 mM Tris-Borat, pH 8.3
890 mM Borsäure
2.5 mM EDTA

Lösung C:
1% $(NH_4)_2S_2O_8$

Nach 45 minütigem Auspolymerisieren der Gele wurden die Proben für 1 h (native Gele) bzw. 1.5 h (denaturierende Gele) bei 225 V in der thermostatisierbaren Gel-Apparatur von BioRad (Model 220) elektrophoretisch aufgetrennt.

a) Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Lösungen wurden wie folgt zusammenpipettiert:

5 ml Lösung A
3 ml Lösung B
25 µl TEMED (BioRad)
ad 28 ml mit H_2O
+ 2 ml Lösung C

Die Proben wurden in 1:10 verdünnter Lösung B mit 50% Glycerin und den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylen-cyanol FF als Marker aufgenommen. Nach einer Vorinkubation der Proben für 30 min bei 20°C wurden sie ebenfalls bei

20°C elektrophoretisch aufgetrennt.

b) Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Die Lösung setzt sich wie folgt zusammen:

14.4	g Harnstoff (= 8M Harnstoff im Gel)
5	ml Lösung A
3	ml Lösung B
10	µl TEMED (BioRad)
ad 28	ml mit H_2O
+ 2	ml Lösung C

Die Proben wurden in 1:10 verdünnter Lösung B mit 50% Glycerin, 4 M Harnstoff und den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylencyanol FF aufgenommen. Nach einer Vorinkubation der Proben bei 65°C für 15 min wurden sie bei 50°C elektrophoretisch aufgetrennt.

Zum Nachweis der aufgetrennten Nukleinsäuren wurden die Polyacrylamid-Gele mit Silber gefärbt. Hierzu wurde eine Methode, die ursprünglich zum Proteinnachweis entwickelt worden war (Sammons et al., 1981), wie folgt modifiziert:

a) Fixieren und Waschen

10% Ethanol, 0.5% HOAc	2 x 10 min

b) Färben

0.19% $AgNO_3$ in H_2O	mind. 30 min

c) Waschen

dest. H_2O	4 x 15 sec

d) Entwickeln

3.0 g	NaOH
17.5 mg	$NaBH_4$
0.8 ml	HCHO (37% w/v)
ad 200 ml	mit H_2O
	10 min

e) Stoppen

0.75 % Na_2CO_3 5 min

Die Silberlösung konnte für etwa 10 Gele benutzt werden. Der Entwickler wurde bei jeder Färbung frisch angesetzt und entgast. Alle oben beschriebenen Schritte wurden auf einem Rundschüttler durchgeführt.

Aufgrund der Empfindlichkeit der Silberfärbung ist auf höchste Sauberkeit aller mit dem Gel oder den Lösungen in Berührung kommenden Gefäße oder Handschuhe zu achten. Technisches Ethanol wurde auf die die Färbung störenden Cl^--Ionen geprüft.

3. Methodenentwicklung

3.1. Entwicklung einer Methode zum Isolieren von Zellkernen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Zahl der Veröffentlichungen über Isolierungen von Zellkernen aus voll ausdifferenziertem grünem Gewebe recht gering. Das liegt darin begründet, daß Pflanzen eine Reihe von Zellkomponenten besitzen, die die Aufarbeitung der Kerne erheblich erschweren:

1) Chloroplasten.

In einem Blatthomogenat ist das Verhältnis von Chloroplasten zu Zellkernen etwa 100:1. Da sich beide im Volumen und Sedimentationsverhalten sehr ähneln, wird verständlich, daß man mit Filtrations- und Sedimentationstechniken nur angereicherte Zellkernfraktionen erhalten kann. Man hat auch versucht, durch Saccharose-Dichtezentrifugation Chloroplasten und Zellkerne zu trennen (Kuehl, 1964; Tautvydas, 1971; Hamilton et al., 1972; Blaschek et al., 1974). Hierzu muß man allerdings so hohe Zuckerkonzentrationen einsetzen, daß aufgrund osmotischer Vorgänge den Kernen Wasser entzogen wird, sie immer weiter schrumpfen, bis schließlich die Membranen zerstört werden.

Auch im mikroskopischen Bild ist die Unterscheidung der grünen Chloroplasten und der Zellkerne nicht so eindeutig, wie das zunächst den Anschein hat. Nicht alle Chloroplasten erscheinen gelblich grün, manche sind schon geschädigt, ausgelaufen, und die Hüllen können mit Zellkernen verwechselt werden. Allein aufgrund ihrer ungeheuren Überzahl werden viele Zellkerne einfach überdeckt, und es wird schwer zu entscheiden, ob z.B. ein weiterer Zentrifugationsschritt zu einer Aufkonzentrierung von 100:1 zu 50:1 geführt hat. All diese Probleme können umgangen werden, wenn zur Isolierung von Zellkernen auf nicht-grünes Gewebe ausgewichen werden kann (Chen, 1975; Luthe, 1980).

2) Zellwände.

Um Zellkerne isolieren zu können, müssen zunächst die Zellen aufgeschlossen werden. Bei tierischem Gewebe wird das z.B. über einen osmotischen Schock erreicht, oder man zerstört die Membran mit den verschiedensten Detergentien. Bei Pflanzen führen diese Methoden aber wegen der Zellwände nicht zum gewünschten Erfolg. Hier haben sich Homogenisatoren mit hochtourig rotierenden Messern bewährt. Allerdings liegen dabei oft zwischen optimalem Aufschluß der Zellen bei maximalem Ertrag an Zellker-

nen auf der einen Seite und Zerstörung der Zellkerne auf der anderen Seite nur wenige Sekunden. Schonendere Homogenisatoren wie Potter oder Douncer dagegen reichen oft nicht aus, die Zellen aufzuschliessen. Um diese Probleme zu umgehen, versuchten einige Autoren, Zellwände und Mittellamellen enzymatisch abzudauen (D'Alessio und Trim, 1968; Jakobi, 1974; Willmitzer und Wagner, 1981). Diese Methode ist zwar sehr schonend, wenn sie überhaupt funktioniert, dauert aber lange, ein Faktor, der bei der Isolierung intakter Zellkerne von entscheidender Bedeutung sein kann. Auch eine Kombination, enzymatischer Abbau mit anschließender Homogenisation, bringt nicht immer den gewünschten Erfolg.

Die angeführten Probleme können umgangen werden, wenn auf Protoplasten für die Zellkernisolierung ausgewichen werden kann (Blaschek et al., 1974; Capesius und Meyer, 1977; Lörz und Potrykus, 1978).

3) Vakuolen.

Pflanzen haben keine den Tieren vergleichbaren Möglichkeiten, die Abfallprodukte ihrer Stoffwechselwege auszuscheiden. Unter anderem lagern sie sie zusammen mit Reservestoffen innerhalb der Zelle in den Vakuolen ab, die bei ausdifferenziertem, altem Gewebe die Zellen fast ganz ausfüllen. Beim Aufschließen solchen Gewebes werden natürlich auch die Inhaltsstoffe der Vakuolen freigesetzt. Besonders schädlich für die Zellkerne sind dabei phenolische Verbindungen und Phenoloxidasen, die Proteine und Nukleinsäuren denaturieren.

Aus diesem Grund ist jeder, der Zellkerne aus pflanzlichem Gewebe isolieren muß, daran interessiert, möglichst junges Material, dazu gehören auch Protoplasten und Zellkulturen, mit möglichst wenig Vakuolen zur Verfügung zu haben.

4) Stärkekörner.

Pflanzen speichern ihre Energie in Form von Stärkekörnern. Das bedeutet, daß voll ergrüntes photosynthetisierendes Gewebe eine enorme Menge dieser Partikel enthält, die alle beim Aufschluß freigesetzt werden. Ein Teil der Stärkekörner ähnelt in der Größe den Zellkernen, die in wesentlich geringerer Anzahl im Homogenat vertreten sind. Damit treten beim Mikroskopieren ähnliche Probleme auf, wie das bereits bei den Chloroplasten erörtert wurde.

Aufgrund der hohen Dichte der Stärkekörner sollten sie von den Zellkernen über Zentrifugation recht einfach abzutrennen sein. Hierzu benutzt man oft die Zentrifugation über ein Saccharosekissen (Kuehl, 1964; D'Alessio und Trim, 1968; Tautvydas, 1971; Hamilton et al., 1972; Chen

et al., 1975; Mennes et al., 1977; Stout und Hurley, 1977). Diese führt allerdings, ähnlich wie bei den Chloroplasten erwähnt, bei den Zellkernen zum Wasserentzug und damit zur Erhöhung ihrer Dichte, so daß sie zum Großteil zusammen mit den Stärkekörnern absedimentiert werden. Auch Trennungen im Saccharosekissen, die die Unterschiede in den S-Werten der Zellkerne und Stärkekörner auszunutzen versuchen, führen kaum zum erwünschten Ergebnis. Man geht deshalb oft dazu über, daß man die Pflanzen zwei Tage vor dem Aufschluß "hungern" läßt, indem man sie im Dunkeln hält und damit die Anzahl an Stärkekörnern reduziert (Kuehl, 1964; D'Alessio und Trim, 1968; Tautvydas, 1971). Man stellt also den Stoffwechsel um, eine Maßnahme, die, abhängig von den zu untersuchenden Fragestellungen, nicht immer durchführbar ist.

5) Cuticula und Wachsschichten.

Die Außenwände der Epidermis der Pflanzen sind stets von einem Cutinhäutchen, der Cuticula, überzogen. Ihre Hauptfunktion besteht darin, schädliche Wasserverluste des Gewebekörpers einzuschränken. Die in gleicher Richtung wirksame Verdickung der Außenwände erhöht außerdem die mechanische Festigkeit der Oberhautzellen. In die cutinisierten Wandschichten ist häufig Wachs eingelagert, das sie ganz besonders undurchlässig für Wasser macht.

Diese beiden Merkmale, mechanische Festigkeit, die eine Rolle bei der Homogenisation spielt, und wasserabstoßende Eigenschaften, machen bei den meisten Pflanzen vor dem Aufschluß des Gewebes eine Vorbehandlung notwendig.

Zunächst kann man die Blätter kurz in Ethanol waschen, zum einen, um Verunreinigungen zu entfernen, zum anderen aber auch, um die Blätter durch Puffer benetztbarer zu machen. In die gleiche Richtung zielt ein Evakuieren des Gewebes am Wasserstrahlvakuum, um z.B. Luftbläschen aus den Spaltöffnungen zu entfernen. Um dann aber ein wirkliches Durchtränken der Blätter mit Puffer zu erreichen, schließen sich meist sehr lange, oft über Nacht dauernde Inkubationen an (Kuehl, 1964; Hamilton et al., 1972; Stout und Hurley, 1977), wenigstens aber über 2 Stunden (D'Alessio und Trim, 1968; Jakobi, 1974). Auf diese langwierige Prozedur soll angeblich verzichtet werden können, wenn man die Blätter für 30 sec in eiskalten Ether taucht (Kuehl, 1964; Hamilton et al., 1972). Hier ist allerdings die Gefahr sehr groß, daß bereits auf der ersten Stufe des Aufschlusses das Gewebe denaturiert und damit die Zellkerne zerstört werden. Die langen Inkubationszeiten wiederum führen dazu, daß bereits

Absterbevorgänge im Gewebe einsetzen.

Aus diesen Gründen wird deutlich, warum viele Autoren, wo dies möglich ist, auf Zellkulturen und Protoplasten zurückgreifen (Blaschek et al., 1974; Capesius und Meyer, 1977; Lörz und Potrykus, 1978; Willmitzer und Wagner, 1981).

Die vorliegende Fragestellung dagegen zielte auf die Isolierung von Zellkernen aus ausdifferenzierten, etwa 6 Wochen alten Tomatenpflanzen. Die einzige Freiheit bestand in der Wahl der Handelssorte. Es zeigte sich dabei, daß Rutgers etwas besser zu handhaben war als die Sorten Rentita und Hilda.

Die im folgenden beschriebene Methode ist also auf Tomatenpflanzen der Handelssorte Rutgers optimiert. Die erzielten Zellkernausbeuten liegen etwas höher als bei anderen Tomatensorten.

3.1.1. Verwendete Puffer

Zusammensetzung der Puffer:

Ausgehend von der Veröffentlichung von Chen et al. (1975) wurden die Zusammensetzungen und Konzentrationen der Puffer weitgehend in der Diplomarbeit optimiert. Wo möglich wurde allerdings die Saccharose durch Mannit ersetzt. Dadurch konnten die Kernausbeuten nochmals um 50% gesteigert werden. Durch Reduktion der Salzkonzentration bei KCL von 15 mM auf 10 mM und vor allem bei $MgCl_2$ von 15 mM auf 5 mM konnte die Tendenz der Zellkerne zum Verklumpen praktisch eliminiert werden. An die Stelle der Sedimentation durch 2 M Saccharose, die, wie bereits erwähnt, die Zellkerne osmotisch stark streßt, trat eine Zentrifugation in 36% iger Percoll-Lösung. Verunreinigungen durch Membranreste konnten beseitigt werden, indem alle Puffer außer Puffer E 0.6% NP 40 enthielten, im Gegensatz zur Diplomarbeit, wo nur einem Puffer dieses Detergenz in einer Konzentration von 0.5% zugesetzt worden war. Mercaptoethanol wurde generell durch DTE ersetzt.

Alle Puffer wurden frisch angesetzt mit autoklaviertem Milli-Q-Wasser. Die Saccharose war RNase frei. Bei Percoll handelt es sich um ein Gradientenmaterial auf Silica-Basis, wobei die Silicat-Partikel Polyvinylpyrrolidon beschichtet sind.

Puffer S: 25 mM MES/NaOH, pH 6.5
10 mM KCL
5 mM $MgCl_2$
0.1 % BSA
1 mM DTE

Puffer A: Puffer S
600 mM Mannit

Puffer B: Puffer S
600 mM Saccharose
40 % Glycerin

Puffer C: Puffer S
600 mM Saccharose
40 % Glycerin
0.6 % NP-40

Puffer D: Puffer S
250 mM Mannit
95 % Percoll
0.6 % NP-40

Puffer E: Puffer S
250 mM Mannit

3.1.2. Identifikation der Zellkerne

Hier konnte auf Untersuchungen zurückgegriffen werden, die während der Diplomarbeit gemacht wurden. Es hatte sich gezeigt, daß keine der klassischen Färbemethoden, wie Methylgrün, Methylenblau, Orcein, Acetokarmin u.s.w., benutzt werden konnte (Romeis, 1968). Gerade bei der Tomate ähneln

sich Chloroplasten, Stärkekörner und Zellkerne in ihrem mikroskopischen Verhalten derart, daß auch bei Benutzung von Phasenkontrastmikroskopie eine Verunreinigung der Zellkerne mit anderen Partikeln nie ausgeschlossen werden kann. Gerade zur Optimierung der Isolierungsmethode war es aber unerläßlich zu bestimmen, wieviel Prozent der Partikel nach einem Reinigungsschritt Zellkerne waren.

Diese Bedingungen erfüllte erst die Fluoreszenzmikroskopie mit Ethidiumbromid. Sie ist nicht nur sehr schnell - eine Vorbehandlung der Proben ist nicht notwendig - sondern erlaubt auch in sehr rohen Proben, abhängig von der Anregungswellenlänge, sehr spezifisch z.B. Zellkerne anzufärben. Das Phasenkontrastbild der entsprechenden Probe zeigt dann ganz klar, was sich außer den Kernen noch in der Probe befindet (Abb. 4-7). Regt man statt mit 546 nm, der Wellenlänge, bei der die Zellkerne tiefrot fluoreszieren, mit 500 nm an, so erscheinen die Zellkerne bei Ethidiumbromid-Färbung hellgelb, zusätzlich aber kann man die Chloroplasten rot leuchten sehen.

Mit Hilfe dieser spezifischen Anfärbung war es möglich, Zellkerne schnell und eindeutig zu identifizieren und den Aufschluß und die Aufreinigung mikroskopisch zu überwachen und zu optimieren.

3.1.3. Isolierungsmethode

Zum Aufschluß wurden 150 g der 4 obersten Blätter von etwa 6 Wochen alten Tomatenpflanzen der Handelssorte Rutgers benutzt.

In der Diplomarbeit konnte gezeigt werden, daß die Isolierungsmethode auch für ältere oder jüngere Pflanzen und ältere Blätter geeignet ist, dort aber die Kernausbeuten geringer werden. Im Gegensatz zur damaligen Vorschrift sowie mehreren Veröffentlichungen (D'Alessio und Trim, 1968; Hamilton et al., 1972) braucht bei der hier beschriebenen Methode die Mittelrippe der Blätter nicht entfernt zu werden.

Die abgeernteten Blätter wurden sofort zweimal mit H_2O gewaschen, 10 sec in 70%igem Ethanol geschwenkt, wieder zweimal mit H_2O nachgewaschen und in 1.5 l Puffer A aufgenommen. Zur Infiltration der Blätter wurde mehrere Male am Ölpumpenvakuum kurz evakuiert und schlagartig belüftet, so lange, bis das Gewebe dunkelgrün, mit Puffer getränkt war. Anschließend wurden die Blätter 30 min bei 4°C inkubiert. Ab jetzt erfolgten alle Schritte der Aufreinigung der Zellkerne im Kühlraum bei 4°C.

Die Inkubationszeit konnte deshalb so drastisch reduziert werden -

bei der Diplomarbeit hatten sich 16 h als optimal erwiesen - ,da durch das bessere Vakuum, das mehrmalige Evakuieren und das schlagartige Belüften die Blätter sehr viel besser mit Puffer infiltriert werden konnten. Der weitere Ablauf der Isolierungsmethode unterscheidet sich, abgesehen von dem Aufschluß des Blattgewebes und der Prozentigkeit des neutralen Detergenz NP 40, die in der Diplomarbeit optimiert worden waren, stark von der dort ausgearbeiteten Vorschrift.

Nach der Inkubation wurde das Blattgewebe in 450 ml Puffer B aufgenommen und für 4 x 5 sec in einem Waring Blendor auf der höchsten Stufe homogenisiert.

Bei Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, daß der Waring Blendor allen anderen gängigen Homogenisatoren überlegen ist und die oben angegebene Aufschlußzeit die höchsten Kernausbeuten liefert. Abb. 4 zeigt ein grobes Blatthomogenat, einmal im Phasenkontrast- und einmal im Fluoreszenzbild. Deutlich erkennbar sind die Haarzellen und die Spaltöffnungen. Die dazugehörigen Zellkerne sind nur in der Fluoreszenzaufnahme zu identifizieren.

Das Homogenat wurde über Miracloth und drei Stahlsiebe mit den Maschenweiten 100 µm, 40 µm und 25 µm filtriert.

Die Geschwindigkeit spielt auf dieser Stufe des Aufschlusses eine entscheidende Rolle, da durch die Homogenisation die Vakuoleninhaltsstoffe freigesetzt werden und auf die Kerne einwirken können.

Der Filterrückstand wurde resuspendiert in 350 ml Puffer B, für 2 x 10 sec homogenisiert und refiltriert.

Dieser Schritt bewirkt eine Erhöhung der Kernausbeute um mindestens 20%. Abb. 5 zeigt deutlich, wie verunreinigt das filtrierte Blatthomogenat noch ist. Im Phasenkontrastbild ist kaum ein Unterschied zu sehen zwischen Stärkekörnern, Chloroplasten und Zellkernen. Erst in der Fluoreszenzaufnahme sind die in der Probe vorhandenen 5 Zellkerne vor dem Hintergrund der schwächer leuchtenden Chloroplasten auszumachen.

Die zusammengefaßten Filtrate wurden auf 0.6% NP 40 eingestellt und für maximal 5 min gerührt.

Diese 0.6% NP 40 sind die Grenzkonzentration, ab der die Chloroplasten quantitativ zerstört werden. Es wurde deshalb keine höhere Konzentration gewählt, um die Zellkerne möglichst wenig zu schädigen. In Puffer A wurde zunächst auf NP 40 verzichtet, da das Detergenz

a)

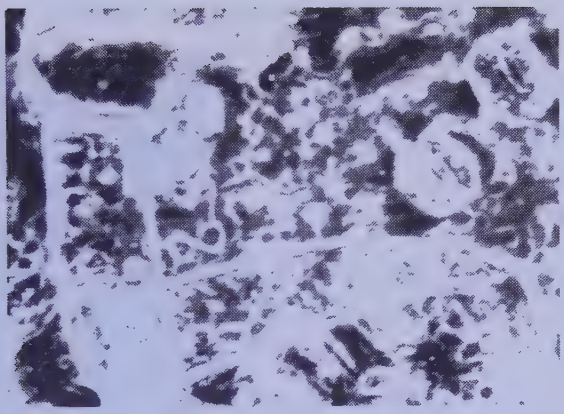

Abb. 4a: Phasenkontrastaufnahme eines groben Blatthomogenats mit mehreren Haarzellen und zwei Spaltöffnungen, Vergrößerung 450fach

b)

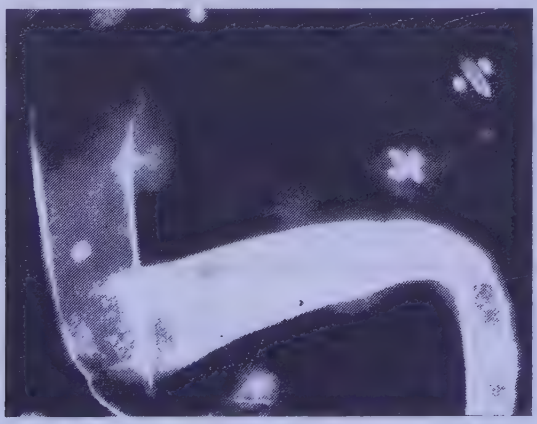

Abb. 4b: Fluoreszenzaufnahme des Präparats der Abb. 4a. Erst mit dieser Färbetechnik werden die Zellkerne in den Haar- und Schließzellen erkennbar (Schumacher, 1979)

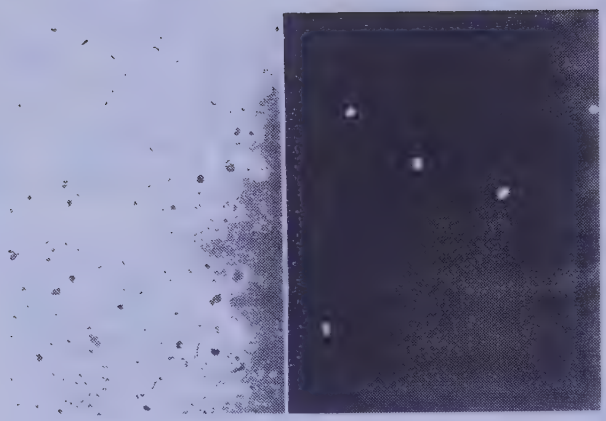

Abb. 5: Filtriertes Blatthomogenat. Vergrößerung 300fach
links: Phasenkontrastaufnahme. Zwischen Zellkernen, Chloroplasten und Stärkekörnern kann nicht unterschieden werden. Nur schwer sind die 5 Zellkerne der Fluoreszenzaufnahme wiederzufinden
rechts: Fluoreszenzaufnahme. Bei den deutlich sichtbaren kräftig leuchtenden Partikeln handelt es sich um Zellkerne, bei den schwach leuchtenden um Chloroplasten (Schumacher, 1979)

während der Homogenisation zu einer sehr starken Schaumbildung führen und so die Filtration praktisch unmöglich machen würde. Alle folgenden Zentrifugationen sind auf maximale Zellkernausbeute optimiert.

Die Zellkerne enthaltende Suspension wurde anschließend für 10 min bei 5000 rpm im JA 14 Rotor (Beckman) in 250 ml Rundboden-Polycarbonat-Bechern zentrifugiert.

Der Festwinkelrotor in Verbindung mit den Rundbodenbechern hat den Vorteil, daß sich das Sediment besser verteilt und damit einfacher zu lösen ist.

Die Überstände wurden verworfen und jedes Sediment in insgesamt 20 ml Puffer D suspendiert. Die vereinigten Suspensionen wurden mit 380 ml Puffer C gemischt und erneut wie oben zentrifugiert.

Es zeigte sich, daß Percoll in hohen Konzentrationen offensichtlich ein sehr guter Lösungsvermittler ist. Aus diesem Grund wurden die Sedimente zunächst in Puffer D suspendiert in einer Menge, die nach

dem Mischen mit Puffer C nicht mehr ins Gewicht fällt. Die Hauptfunktion von Puffer C besteht darin, daß in ihm, aufgrund der 40% Glycerin, die Chloroplastentrümmer in einer hochviskosen, dunkelgrünen Schicht flotieren. Vor dem Dekantieren der Überstände sollte die Schicht sorgfältig entfernt werden, um zu vermeiden, daß Chloroplastenreste wieder in die Sedimente schmieren.

Die Sedimente wurden in 3 ml Puffer D suspendiert, zusammengefaßt und mit 150 ml Puffer C gemischt.

Wie aus Abb. 6 ersichtlich wird, befinden sich außer den Zellkernen praktisch keine fluoreszierenden Partikel mehr in der Suspension.

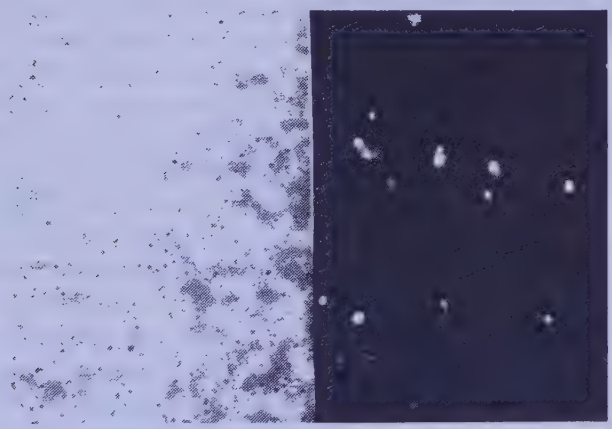

Abb. 6: Grobe Kernsuspension nach Lyse der Chloroplasten. Vergrößerung 300fach
links: Phasenkontrastaufnahme. Es ist unmöglich, unter der großen Zahl an Stärkekörnern die wenigen Zellkerne zu finden.
rechts: Fluoreszenzaufnahme. Es sind keine Chloroplasten mehr zu erkennen. Die sehr kleinen, schwach leuchtenden Partikel gehen auf Reste von Chloroplasten und Zellkernen zurück. Die scheinbare Größe der Zellkerne liegt an einer Überbelichtung. Tatsächliche Lage und Größe der Kerne spiegeln die manchmal in den Flecken sichtbaren zentralen Punkte wieder (Schumacher, 1979)

Die Suspension wurde für 5 min bei 5000 rpm in der Minifuge II (Heraeus-Christ) in Glasbechern zentrifugiert. Nach Entfernen der letzten Chloroplastenreste und Abkippen des Überstandes wurden die Sedimente in 45 ml Puf-

fer D (Dichte 1.13) suspendiert und für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. In diesem Schritt werden die viel dichteren Stärkekörner von den Zellkernen getrennt. Wie aus Gradientenzentrifugationen mit Percoll bekannt war (Schumacher, 1980), verteilen sich die Kerne über einen Dichtebereich von 1.08-1.10, d.h. 60-70% Percoll. Theoretisch sollten also in Puffer D mit seiner Dichte von 1.13 alle Zellkerne flotieren. Aufgrund der sehr hohen Konzentration an Stärkekörnern werden aber einige Kerne ins Sediment mitgerissen. Deshalb wird dieser Schritt solange wiederholt, bis keine sichtbaren Mengen an Zellkernen mehr flotieren.

Die in Form eines grauen Häutchens flotierenden Zellkerne wurden vorsichtig abgehoben, zu 28 ml Puffer E gegeben und mit Puffer D auf 45 ml aufgefüllt, was einer Konzentration von 36% Percoll und einer Dichte von 1.05 entspricht. Die Zellkerne wurden aus der Suspension durch Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde mehrmals rezentrifugiert, um die Kerne quantitativ zu erhalten. Die sedimentierten Zellkerne wurden suspendiert, zusammengefaßt und durch dreimaliges Rezentrifugieren in Puffer E für 5 min bei 2500 rpm gewaschen.

Diese Waschschritte sind notwendig, da geringste Spuren an Percoll in der Kernsuspension deren weitere Aufarbeitung, egal, ob Aufschluß mit Phenol/Chloroform, Ultraschallbehandlung oder Absorptionsmessungen, erschweren, wenn nicht sogar unmöglich machen. Enthalten die Zellkerne noch Stärkekörner, so kann die Percoll-Kissen-Zentrifugation wiederholt werden. Danach sind, wie auch Abb. 7 zeigt, praktisch 100 % der im Mikroskop erkennbaren Partikel Zellkerne.

Die Zellkerne wurden entweder in Puffer E, der 50% Glycerin enthielt, bei -20°C gelagert oder als Sediment bei -70°C eingefroren.

3.1.4. Reinheit und Ertrag

Die Reinheit der Zellkerne wurde mikroskopisch mit Hilfe von Phasenkontrast und Fluoreszenz überprüft (Abb. 7). Sie muß mit mindestens 98% angegeben werden. Kernaggregate waren so gut wie keine vorhanden und wenn, dann höchstens in Ansammlungen von 5-10 Zellkernen. Sowohl Kerne aus kranken, als auch aus gesunden Pflanzen hatten einen mittleren Durchmesser von 4 µm, wobei in dem Bereich von 3-5 µm 93% der Zellkerne aus gesundem, aber nur 73% der aus infiziertem Gewebe lagen. Der Anteil an Zellkernen mit größerem

Abb. 7: Hochreine Zellfraktion. Sowohl die Phasenkontrast- (links) als auch die Fluoreszenzaufnahme (rechts) zeigen deutlich die Reinheit der Fraktion. Es sind praktisch nur Zellkerne zu erkennen. Der Maßstab entspricht 20 µm

Durchmesser ist bei viroid-infizierten Pflanzen erheblich höher. In vielen Zellkernen waren Nukleoli zu erkennen (Abb. 8), wobei die Zahl der Zellkerne ohne Nukleoli bei solchen aus gesundem Gewebe erheblich höher war.

Der Ertrag an Zellkernen wurde mit Hilfe einer Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Unter optimalen Bedingungen konnten aus 100 g infizierter Blätter $1 \cdot 10^9$ Kerne isoliert werden, aus gesunden $2 \cdot 10^9$. Legt man zugrunde, daß die Zellzahl in 1 g Tomatenblattgewebe $5 \cdot 10^8$ beträgt (Brüggemann, 1982), so konnten also aus kranken Pflanzen bis zu 2% aller Zellkerne, aus gesunden bis zu 4% isoliert werden. Eine so hohe Ausbeute bei gleichzeitig hochreinen Zellkernen wird meines Wissens nach von keiner anderen Methode erreicht. Der Zeitaufwand für den Aufschluß beträgt, vom Abschneiden der Blätter bis zum letzten Sedimentieren, 3 h. Das ist ein Wert, der nur von wenigen anderen Methoden erreicht wird (Willmitzer und Wagner, 1981).

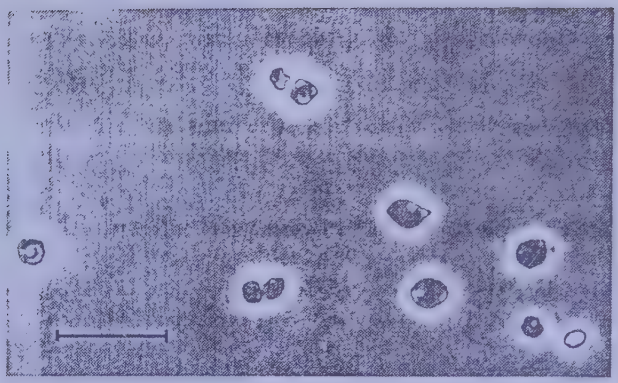

Abb. 8: Phasenkontrastaufnahme hochreiner Zellkerne, isoliert aus mit PSTV infiziertem Tomaten-Blattgewebe. In fast jedem Zellkern ist ein Nukleolus zu erkennen. Der Maßstab entspricht 20 µm

3.2. Entwicklung eines Gelelektrophorese-Verfahrens zum Nachweis von Viroiden in Zellkernen

3.2.1. Eindimensionale Gelelektrophorese

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellte die eindimensionale Gelelektrophorese die Technik dar, um Viroid nach mehreren Vorfraktionierungen in infizierten Pflanzen nachzuweisen. Es lag also nahe, bei der Frage nach der Lokalisierung der Viroide innerhalb der Zelle diese Methode auf die jetzt hochrein zur Verfügung stehenden Zellkerne anzuwenden. Hierzu wurde aus diesen, wie unter **Methoden** beschrieben, die Nukleinsäure isoliert. Der Hochsalzpuffer brachte dabei die Kerne zur Lyse, das Chromatin denaturierte und wurde besser für die DNase zugänglich. Der enzymatische Schritt war unerläßlich, da die unzerstörte lange, in enormen Mengen in den Zellkernen vorkommende DNA nicht in einem so kleinen Volumen Puffer löslich war, wie das für die Elektrophorese notwendig gewesen wäre. Da die DNase noch RNase-Aktivität hatte, wurde mit dem Vanadyl-Komplex gearbeitet. Der anschließende Proteinase K-Schritt zusammen mit dem SDS erleichterte das Freisetzen

der Nukleinsäuren aus den Komplexen mit den Proteinen und damit die Phenolextraktion. Jeweils 1/10 der aus 100 g Blätter erhaltenen Zellkern-Nukleinsäure wurde elektrophoretisch aufgetrennt.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Silberfärbung in unserem Institut noch nicht etabliert. Die Nukleinsäuren wurden auf den Gelen mit "stains all" Lösung sichtbar gemacht, einer relativ unempfindlichen Methode (Abb. 9).

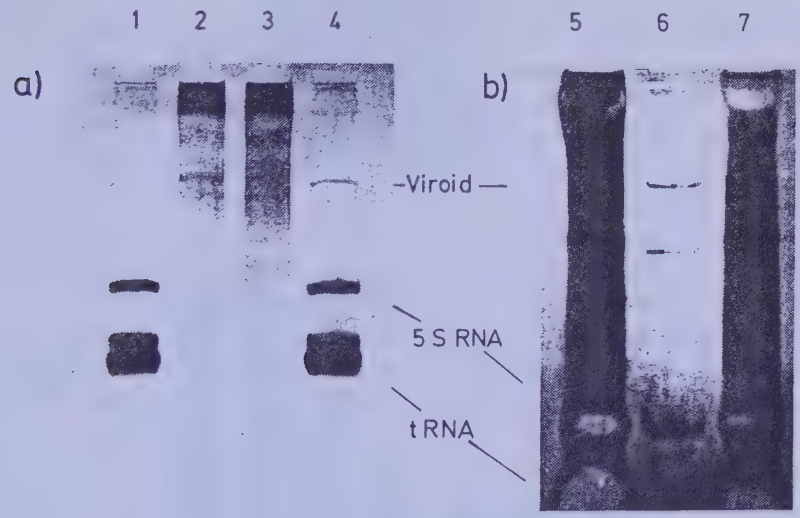

Abb. 9: Native (a) und denaturierende (b) Polyacrylamid-Gelelektrophorese von aus Zellkernen isolierter Nukleinsäure. Die Gele sind mit "stains-all" gefärbt
1, 4 und 6: Nukleinsäure-Rohextrakte aus gesunden Pflanzen.
2 und 3: Nukleinsäure aus $5 \cdot 10^7$ Zellkernen von gesundem (2) und krankem (3) Gewebe
5 und 7: Nukleinsäure aus $1 \cdot 10^9$ Zellkernen von krankem (5) und gesundem (7) Gewebe

Als nach den ersten Elektrophoresen der Kernnukleinsäuren keine eindeutigen Aussagen über das Vorhandensein von Viroid in Zellkernen aus infiziertem Gewebe gemacht werden konnten, stellte sich die Frage, ob diese überhaupt theoretisch, selbst wenn alle in der Pflanze vorkommenden Viroide in den Zellkernen lokalisiert wären, nachgewiesen werden könnten. Hierzu wurde davon ausgegangen, daß 1 kg stark infizierter Blätter 1 mg Viroid enthält (Colpan et al., 1983). Damit sollten sich in den Zellkernen aus 100 g Blät-

ter bei einer Kernausbeute von 2% 20 µg Viroid-RNA befinden. Da die Nukleinsäure in dem obigen Beispiel in einem recht großen Volumen gelöst worden war, so daß nur 1/10 der Gesamtmenge auf das Gel aufgetragen werden konnte, befand man sich bereits an der Nachweisgrenze der Färbung. Wenn überhaupt Viroid erkennbar sein sollte, dann mußte pro Gel die Gesamtmenge an Kernnukleinsäure elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hier war nun aber sehr bald erkennbar, daß sich im Bereich, in dem die Viroid-RNA erwartet wurde, sehr viele Banden und sehr viel stärkere als die gesuchte befanden (Abb. 9b). Die aus den Zellkernen isolierte Nukleinsäure mußte also für weitergehende Untersuchungen fraktioniert werden.

Allerdings führte keine der gängigen Fällungsmethoden, wie z.B. LiCl, das lange RNA von kurzer RNA und DNA trennt, oder CTAB, das DNA von RNA trennen kann (Jones, 1963; Bellamy und Ralph, 1968), zum gewünschten Ergebnis. Das lag wahrscheinlich zum einen an dem enormen DNA Überschuß der Kernnukleinsäuren, zum anderen an dem doch absolut gesehen relativ geringen RNA Anteil; alle Fällungen sind bekanntlich konzentrationsabhängig. Aber auch das Zusetzen von RNA, um die Fällung quantitativ ablaufen zu lassen, führte nicht zum Ziel. Die besten Ergebnisse konnten noch erreicht werden mit einer Cs_2SO_4-Fraktionierung (Colpan et al., 1983) mit zugesetzter RNA aus gesunden Pflanzen in Verbindung mit der mittlerweile im Labor etablierten Silberfärbung. Die Fraktion, die das Viroid - wenn vorhanden - enthalten sollte, wurde entsalzt, umgefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die mehr als um den Faktor 100 im Vergleich zur "stains-all"-Färbung empfindlichere Silberfärbung (Abb. 10) ermöglichte es jetzt, auch Nukleinsäuren nachzuweisen, die in Zellkernen nur in geringsten Konzentrationen vorliegen. Der Nachteil bestand nun aber darin, daß die Gele so übersät mit Banden waren, daß eine exakte Zuordnung unmöglich erschien (Abb. 11). Es konnte also nicht eindeutig gezeigt werden, daß Viroide in infiziertem Blattgewebe im Zellkern lokalisiert sind.

An dieser Stelle muß nochmals darauf hingewiesen werden, daß zu Beginn dieser Arbeit Viroide noch nicht kloniert waren, bzw. die im Laufe der ersten Jahre konstruierten Klone uns nicht zur Verfügung standen, so daß ein Hybridisieren mit cDNA, wobei aus der großen Menge störender Nukleinsäure die Viroid-RNA herauszufinden wäre, nicht möglich war.

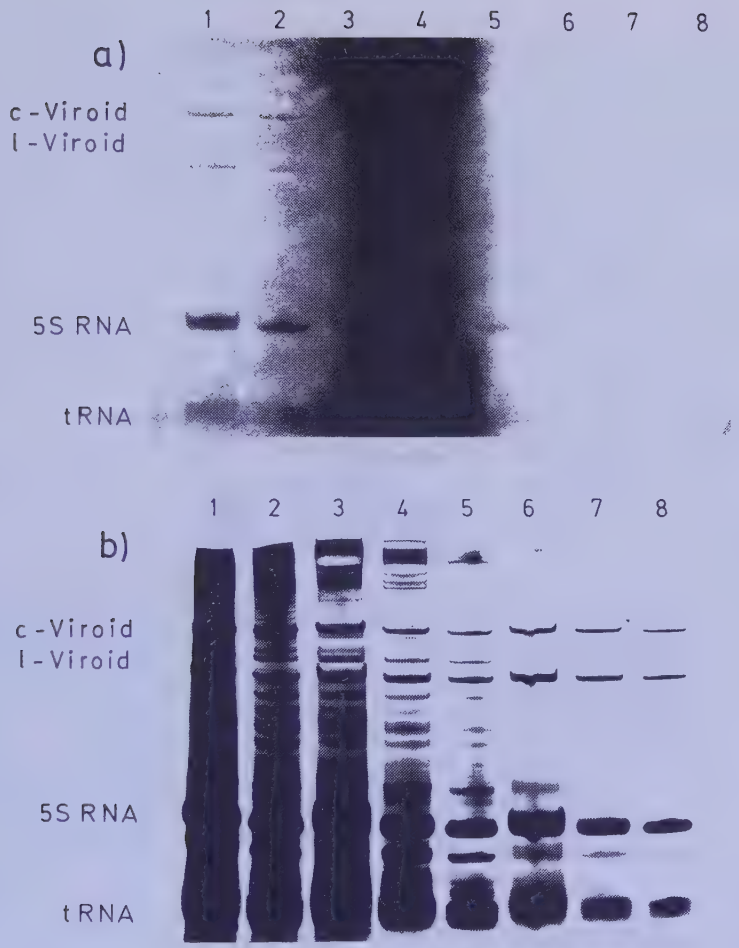

Abb. 10: Verdünnungsreihe eines Nukleinsäure-Rohextraktes aus Viroid-infiziertem Gewebe. Das Gel in (a) ist "stains-all" gefärbt, das in (b) nach der Silberfärbevorschrift. Beide Gele enthalten auf den entsprechenden Bahnen dieselben Nukleinsäuremengen. Von einer Bahn zur nächsten wurden die Proben 1:2 mit H_2O verdünnt. Selbst die 1:256 Verdünnung (b, Bahn 8) läßt auf dem Silber gefärbten Gel noch mehr Banden erkennen als die "stains-all" gefärbte unverdünnte Nukleinsäureprobe (a, Bahn 1). Die Positionen der tRNA-, 5S RNA- und Viroid-Banden sind markiert.

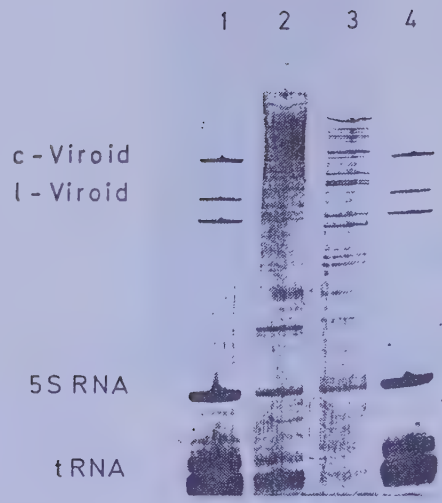

Abb. 11: Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von aus Zellkernen isolierter und fraktionierter Nukleinsäure. Nach Zusatz von 1 mg RNA aus gesunden Pflanzen zur besseren Fraktionierung der isolierten Kernnukleinsäuren sind DNA und lange RNAs über Cs_2SO_4-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt worden. Das Gel ist mit Silbernitratlösung (siehe Methoden) gefärbt
1,4: Nukleinsäure-Rohextrakte aus infizierten Pflanzen
2: fraktionierte Nukleinsäure aus $2 \cdot 10^6$ Zellkernen von PSTV-infiziertem Gewebe
3: fraktionierte Nukleinsäure aus $2 \cdot 10^6$ Zellkernen von gesundem Gewebe
Die Lage der tRNA-, 5S RNA- und Viroid-Banden sind markiert

3.2.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese nutzt die Tatsache aus, daß Nukleinsäuren unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliches Laufverhalten zeigen. So lassen sich RNAs und DNAs, die in der 1. Dimension exakt gleich laufen, durch Änderung des pH-Wertes, der Temperatur oder z.B. der Harnstoffkonzentration im Gel in der 2. Dimension trennen (Vigne und Jordan, 1971; Burckhardt und Birnstiel, 1978; Fischer und Lerman, 1979; De Wachter und Fiers, 1982). Andererseits ist aus physikochemischen Untersuchungen bekannt, daß Viroide während der Denaturierung, z.B. durch Hitze oder Harnstoff, von der hoch basengepaarten Stäbchenform in die offene Ringform mit nur wenigen oder keinen Basenpaaren übergehen (Henco, 1979; Henco et al.,

1979). Diese Eigenschaft macht sich in einer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit bemerkbar (Riesner et al., 1979; Sänger et al., 1979; Palukaitis und Symons, 1980; Imperial et al., 1982; Randles et al., 1982). Unter denaturierenden Bedingungen, also wenn das Viroid als Ring vorliegt, läuft es auf dem Gel relativ zu den übrigen RNAs ähnlichen Molekulargewichts langsamer als unter nativen Bedingungen.

Es lag also nahe, die Eigenschaften des Viroids mit der Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu verknüpfen. Es sollte damit möglich sein, aufgrund der besonderen Struktur der Viroide und damit des außergewöhnlichen elektrophoretischen Verhaltens auch in sehr rohen Nukleinsäureproben geringste Konzentrationen der Viroid-RNA nachweisen zu können.

Zunächst wurde zum Optimieren der Methode Nukleinsäure-Rohextrakt aus gesunden und kranken Pflanzen benutzt. Die Proben wurden 30 min bei 20°C vorinkubiert, um zu gewährleisten, daß die Viroide wirklich in ihrer nativen Struktur vorlagen, und dann unter nativen Bedingungen der Elektrophorese unterworfen. Danach wurde die entsprechende Bahn ausgeschnitten, um 90° gedreht in einer zweiten Gelkammer am Boden einpolymerisiert und von unten nach oben unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Der linke Teil der Abb. 12 veranschaulicht noch einmal schematisch die Technik der zweidimensionalen Elektrophorese. Die Silberfärbung der Gele mit den aufgetrennten Rohextrakten zeigte das erwartete Ergebnis (Abb. 13). Deutlich bleibt in der infizierten Probe eine Bande hinter der Lauffront der übrigen RNAs zurück. Durch Zusetzen von reinem Viroid zu Nukleinsäureextrakt aus gesunden Pflanzen konnte eindeutig gezeigt werden, daß es sich bei dieser Bande um Viroid-RNA handelt. Dabei wurde auch deutlich, daß eine Vorfraktionierung der Proben durch LiCl, CTAB oder Dichtegradienten-Zentrifugation, wie zu Beginn dieses Kapitels beschrieben, nicht notwendig ist. Eine einfache Nukleinsäureextraktion genügt.

Damit ist es also mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese in Verbindung mit der Tomatenschnellaufschluß-Methode und der Silberfärbung möglich geworden, innerhalb eines Tages in rohen Nukleinsäureextrakten Viroid in sehr geringer Konzentration nachzuweisen. Es kann dadurch bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Infektion in den Pflanzen nachgewiesen werden. Ein Nachteil der zweidimensionalen Elektrophorese liegt darin, daß pro Gel immer nur eine Probe aufgetrennt werden kann. Das bedeutet aber auch, daß zwei Proben oder Verdünnungsreihen von Proben, eben weil sie nicht direkt auf einem Gel nebeneinander aufgetrennt werden können und die Silberfärbung zur Bestimmung absoluter Viroidkonzentrationen nur in einem

kleinen Bereich geeignet ist, nicht so ohne weiteres verglichen werden können.

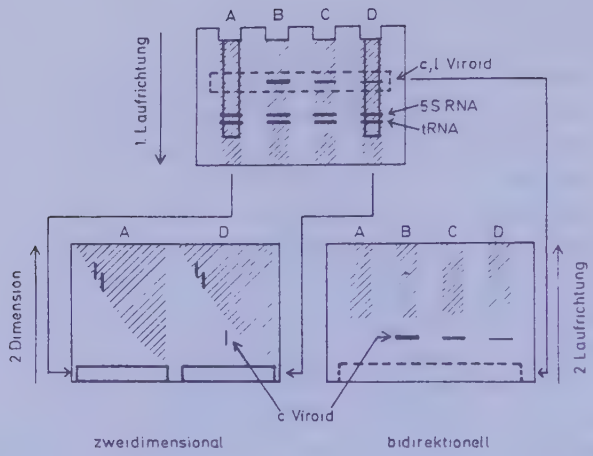

Abb. 12: Schematische Darstellung der Präparation von zweidimensionalen und bidirektionellen Gelen. Die erste Laufrichtung (unter nativen Bedingungen) ist für beide Techniken identisch. Für die zweidimensionalen Gele wird der mit der durchgezogenen Linie umrandete Streifen herausgeschnitten, für die bidirektionellen der mit der gestrichelten Linie. Im Falle der bidirektionellen Gele wird der ausgeschnittene Gelstreifen in derselben Orientierung für die zweite Laufrichtung einpolymerisiert. Die schraffierten Bereiche der 2. Dimension stellen den Teil dar, über den die Komponenten der sehr rohen Nukleinsäureextrakte gesunder und kranker Pflanzen schmieren, ohne, außer der Viroid-RNA, in definierte Banden aufgelöst zu werden. Die Positionen der tRNA-, 5S RNA- und Viroid-Banden sind auf dem Gel der ersten Laufrichtung in dem gestrichelten Bereich zwar markiert, im Experiment aber nicht sichtbar

3.2.3. Bidirektionelle Gelelektrophorese

Die Technik der bidirektionellen Gelelektrophorese wurde entwickelt, um die Vorteile der zweidimensionalen Elektrophorese mit der Möglichkeit, mehrere Proben auf einem Gel aufzutrennen, zu verbinden. Wiederum werden die im vorigen Kapitel beschriebenen physikochemischen Eigenschaften der Viroide ausgenutzt. Die Gel- und Probenbedingungen sind dabei identisch mit denen der zweidimensionalen Elektrophorese. Der Unterschied liegt allein darin, daß nach der ersten Dimension nicht die ganze Bahn herausgeschnit-

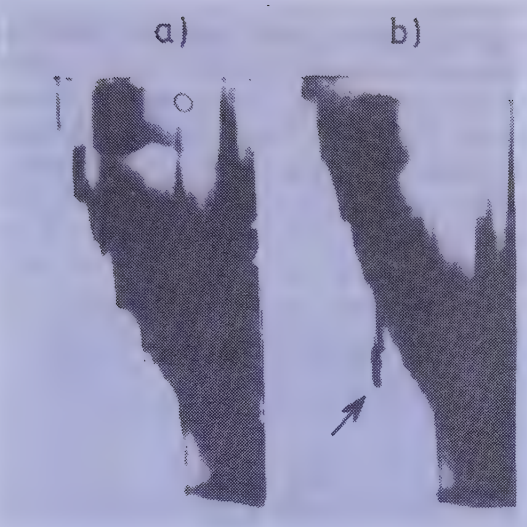

Abb. 13: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Rohextrakten. 10% des aus 0.1 g krankem (b) und gesundem (a) Pflanzengewebe erhaltenen Rohextraktes wurde unter nativen Bedingungen in horizontaler Richtung bei 225 V für 1 Stunde und denaturierend vertikal bei ebenfalls 225 V für 1.5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Viroid-Bande ist in (a) klar unterhalb der diagonal verlaufenden Front zu erkennen (siehe Pfeil)

ten wird, sondern quer zur Laufrichtung ein 1 cm breiter Gelstreifen, der, wenn vorhanden, die Viroid-RNA enthält. Dieses Gelstück wird für die 2. Dimension so einpolymerisiert wie beim zweidimensionalen Gel beschrieben. Dabei ist es günstig, die Orientierung des Streifens beizubehalten, d.h. Oberkante bleibt Oberkante. Das eben Beschriebene ist im Vergleich mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese ebenfalls in Abb. 12, rechte Hälfte, veranschaulicht.

Um sicher zu sein, daß man beim Herausschneiden des Gelstreifens bei der bidirektionellen Elektrophorese eventuell vorhandene Viroid-RNA nicht verfehlt, gibt es folgende Möglichkeiten:

a) Unter den beschriebenen nativen Gelbedingungen läuft der Farbstoff Xylencyanol FF exakt mit der Viroid-RNA. Schneidet man also den Farbstoffmarker aus, so enthält der etwa 1 cm breite Gelstreifen auch, soweit vorhanden, Viroid.

b) Man läßt auf jedem Gel 0.1 µg hochreines Viroid als Referenz mitlaufen und bestimmt dessen Position über Ethidiumbromid-Färbung. Hierzu inkubiert man nach der 1. Dimension das Gel 5 min in Elektrophorese-Puffer, der 0.5 µg/ml Farbstoff enthält. Danach schneidet man quer über das Gel rechtwinklig zur Laufrichtung einen 1 cm breiten Streifen aus, der die gefärbte RNA enthält. So ist gewährleistet, daß sich in den zu untersuchenden Proben vorhandenes Viroid ebenfalls in dem Streifen befindet.

Wie eindeutig die Ergebnisse der bidirektionellen Elektrophorese sind, ist in Abb. 14 gezeigt. Als Proben wurden die in Abb. 13 zweidimensional aufgetrennten Nukleinsäuren benutzt.

Abb. 14: Bidirektionelle Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Rohextrakten und sauberer Viroid-RNA. Die Proben wurden zunächst vertikal abwärts unter nativen Bedingungen bei 225 V für 1 Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bahnen enthalten 10% des aus 0.1 g gesundem (1) und krankem (2) Blattgewebe gewonnenen Extrakts. Auf Bahn 3 wurden 20 ng PSTV-RNA aufgetrennt. Die zweite Laufrichtung der Elektrophorese erfolgte vertikal aufwärts unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff, 225 V, 50°C) für 1.5 Stunden. Die Position der zirkulären Viroid-RNA ist durch einen Pfeil markiert

Die Leistungsfähigkeit dieser Methode sollte anhand von Viroid-Verdünnungsreihen nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst 20 ng reines Viroid jeweils 1:2 mit H_2O verdünnt und bidirektionell aufgetrennt (Abb. 15). Auch in der 8. Verdünnung ist noch eine Bande zu sehen, d.h. 80 pg Viroid-RNA können nachgewiesen werden.

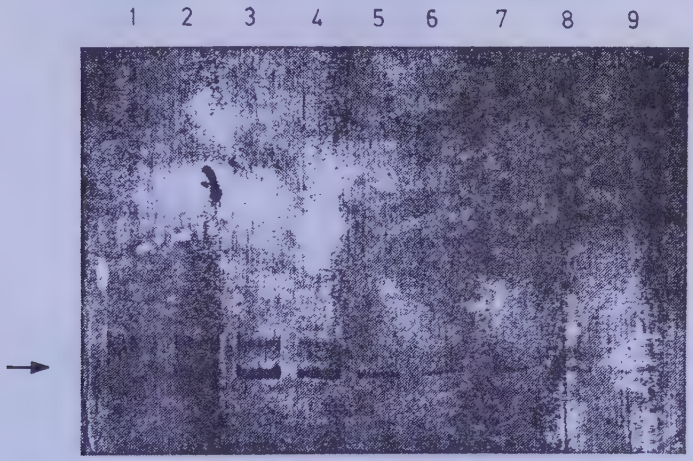

Abb. 15: Bidirektionelle Gelelektrophorese reiner Viroid-RNA unter den Bedingungen von Abb. 14. Ausgehend von 20 ng wurden die Proben je 1:2 mit H_2O verdünnt. Die Banden enthalten: 20 ng (1), 10 ng (2), 5 ng (3), 2.5 ng (4), 1.25 ng (5), 0.63 ng (6), 0.31 ng (7), 0.16 ng (8) und 0.08 ng PSTV-RNA (9). Die Position der zirkulären RNA ist durch einen Pfeil markiert. Bei der darüberliegenden Bande handelt es sich um die in jeder Präparation vorhandenen linearen Moleküle

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Nachweisgrenze von der übrigen in der Probe vorhandenen Nukleinsäure abhängig ist. Dazu wurden 25 ng reines Viroid mit der Nukleinsäure aus 160 mg gesundem Blattgewebe gemischt und jeweils 1:$\sqrt{10}$ verdünnt, einmal mit der oben angeführten Menge an gesundem Rohextrakt (Abb. 16) und einmal mit H_2O (Abb. 17). Auf beiden Gelen kann man in der 5. Verdünnung die Viroid-Bande noch sehen, d.h. wiederum liegt die Nachweisgrenze bei 80 pg Viroid-RNA. Im Fall der Verdünnung mit gesundem Rohextrakt heißt das, daß man in einem Nukleinsäureextrakt aus 160 mg Gewebe noch 80 pg Viroid nachweisen kann; bei einer Zell-

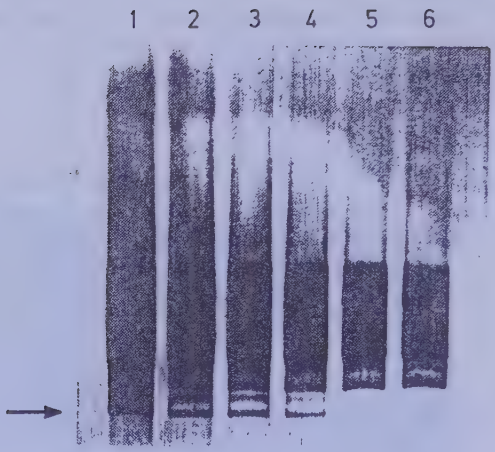

Abb. 16: Bidirektionelle Gelelektrophorese eines Gemisches von reiner Viroid-RNA mit einem Nukleinsäure-Rohextrakts aus gesundem Gewebe unter den Bedingungen von Abb. 14. Ausgehend von 25 ng reiner PSTV-RNA plus 160 mg Rohextrakt wurden die Proben jeweils 1:$\sqrt{10}$ mit gesundem Rohextrakt verdünnt. Die Bahnen enthalten an PSTV-RNA und gesundem Rohextrakt: 25 ng + 320 mg (1), 7.9 ng + 210 mg (2), 2.5 ng + 176 mg (3), 0.79 ng + 165 mg (4), 0.25 ng + 162 mg (5) und 0.08 ng + 160 mg (6). Die Position der zirkulären Viroid-RNA ist durch einen Pfeil markiert

zahl von $5 \cdot 10^8$ pro Gramm Blattgewebe (Brüggemann, 1982) entspricht das 5 Kopien pro Zelle. Gelänge es, den Nukleinsäureextrakt konzentrierter aufzunehmen, z.B. durch weitere Reinigungsschritte, so könnte zwar nicht die durch die Silberfärbung bedingte absolute Empfindlichkeit gesteigert, wohl aber die nachweisbare Viroid-Konzentration pro Zelle weiter reduziert werden.

Zusammenfassend lassen sich die Vor- und Nachteile der beiden Elektrophoresetechniken wie folgt formulieren:

1) Die zweidimensionale Gelelektrophorese erlaubt den Nachweis unbekannter Nukleinsäuren, sofern diese ringförmig einzelsträngig sind, und ist nicht von einer spezifischen Sequenz abhängig. Zirkuläre Moleküle wie die Viroide (Abb. 13) oder auch Virusoide (Abb. 18) - viroidähnliche, zirkuläre virale RNAs - fallen deutlich aus der Front der übrigen Nu-

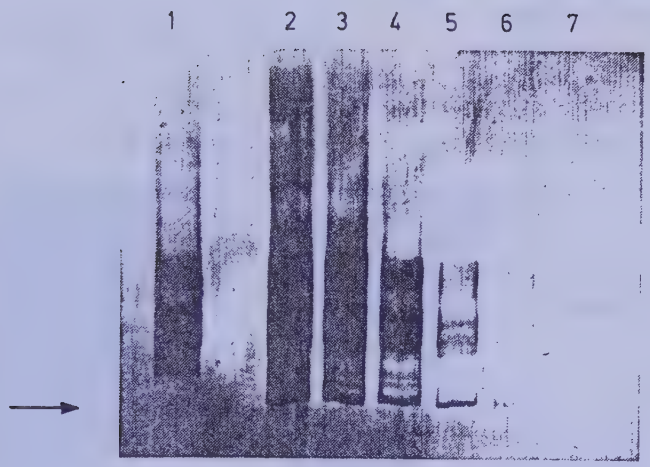

Abb. 17: Bidirektionelle Gelelektrophorese eines Gemisches von reiner Viroid-RNA mit einem Nukleinsäure-Rohextrakt aus gesundem Gewebe unter den Bedingungen von Abb. 14. Ausgehend von 25 ng reiner PSTV-RNA und 160 mg gesundem Rohextrakt wurden die Proben jeweils $1:\sqrt{10}$ mit H_2O verdünnt. Die Bahnen enthalten an PSTV-RNA und gesundem Rohextrakt: 25 ng + 160 mg (2), 7.9 ng + 50 mg (3), 2.5 ng + 16 mg (4), 0.79 ng + 5 mg (5), 0.25 ng + 1.6 mg (6) und 0.08 ng + 0.5 mg (7). Bahn 1 enthält 80 mg gesunden Rohextrakt. Die Position der zirkulären Viroid-RNA ist durch einen Pfeil markiert.

kleinsäuren heraus. Ein ähnliches, wenn auch nicht so ausgeprägtes Verhalten können ansonsten allenfalls noch Moleküle mit einer besonders ausgezeichneten Sekundärstruktur zeigen. Für den Test ist es nicht nötig, die Proben besonders vorzubehandeln, also z.B. DNA, Polysaccharide, ribosomale RNA u.s.w. abzutrennen. Der Nachteil der zweidimensionalen Elektrophorese besteht darin, daß immer nur eine Probe pro Gel untersucht werden kann.

2) Die bidirektionelle Gelelektrophorese dagegen erlaubt das gleichzeitige Auftrennen mehrerer Proben auf einem Gel. Der Nachteil liegt hier darin, daß das Laufverhalten der zu untersuchenden Nukleinsäuren bereits bekannt sein muß.

Optimal werden beide Verfahren, z.B. beim Test auf Viroide, folgendermaßen kombiniert: mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese kann

jede beliebige Viroid-RNA gefunden werden. In der bidirektionellen Gelelektrophorese können dann Serien von Proben auf dieses neu gefundene Viroid hin getestet werden.

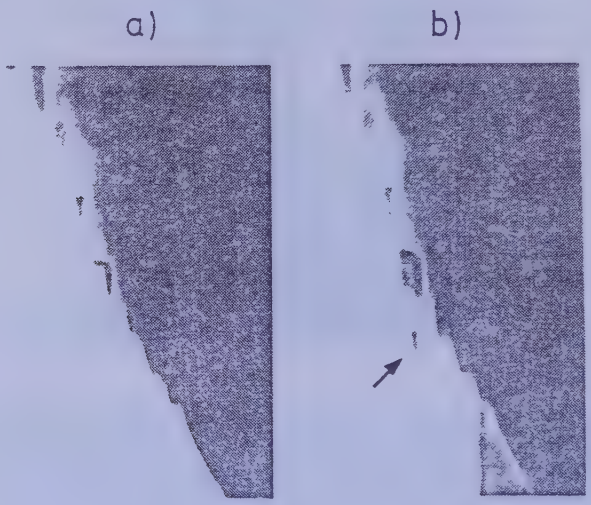

Abb. 18: Zweidimensionale Gelelektrophorese von gesundem Rohextrakt und zugesetztem Virusoid. Es handelt sich hierbei um die Virusoid-RNA vom **v**elvet **t**obacco **m**ottle **v**irus, die freundlicherweise von J. Randles zur Verfügung gestellt wurde. 5% eines Rohextraktes aus 0.1 g gesundem Blattgewebe (a) plus 5 ng VTMoV-RNA 2 (b) wurden entsprechend den Bedingungen von Abb. 13 wie bekannt in den zwei Dimensionen elektrophoretisch aufgetrennt. Der Pfeil bezeichnet die Position der zirkulären VTMoV-RNA 2. Der Schatten zwischen dieser Bande und der Front der übrigen Nukleinsäuren ist auf die linearen Moleküle zurückzuführen.

4. Lokalisierung und Organisation der Viroide im Zellkern

4.1. Nachweis der Viroide im Zellkern

Zwei Grundvoraussetzungen zur Beantwortung der zu Beginn gestellten Frage nach der Lokalisierung der Viroide im Zellkern infizierter Pflanzen waren also erfüllt:

1) Es war gelungen, Zellkerne in großen Ausbeuten hochrein aus Blattgewebe zu isolieren.
2) Mit Hilfe der zweidimensionalen und bidirektionellen Gelelektrophorese war eine Technik zur Hand, die es erlaubte, Viroid sehr empfindlich und hochspezifisch nachzuweisen.

Als nächstes wurde nun aus den Zellkernen von gesundem und krankem Blattgewebe, wie unter **Methoden** beschrieben, die Nukleinsäure extrahiert und zweidimensional (Abb. 19) und bidirektionell aufgetrennt (Abb. 20). Deutlich ist auf beiden Abbildungen die Viroid-Bande zu sehen. Damit konnte erstmals eindeutig nachgewiesen werden, daß in Zellkernen aus infiziertem Gewebe Viroid-RNA in bestimmbarer Konzentration vorhanden ist. Bevor auf die Kopienzahl eingegangen wird, soll zunächst die Frage geklärt werden, ob die Viroide innerhalb der Zelle nur im Zellkern lokalisiert oder vielleicht auch in den Chloroplasten oder dem Cytoplasma nachweisbar sind. Dies zu überprüfen, gibt es zwei Möglichkeiten:

1) Man untersucht den Rest der in der Zelle verbleibenden Organellen und den Zellsaft selbst auf Viroid-RNA.
2) Man setzt die Viroidmenge in den Zellkernen in Korrelation zur Gesamtmenge an Viroid in den entsprechenden Pflanzen.

Nur eine Kombination dieser beiden Verfahren kann zum Ziel führen, da zwar Organellen, wie z.B. Chloroplasten, sehr empfindlich untersucht werden können, andere Komponenten wie das Cytoplasma jedoch einer Isolierung nicht zugänglich sind. Auch die Untersuchung der bei der Kernisolierung normalerweise verworfenen Fraktionen auf Viroidgehalt kann natürlich nicht zur Klärung beitragen, da sich dort die 96% während der Hochreinigung zerstörten Zellkerne befinden. Zunächst sollte deshalb die Viroidmenge in Zellkernen aus infiziertem Gewebe quantitativ über einen Intensitätsvergleich der zirkulären Viroid-Bande mit Banden bekannter Viroidkonzentrationen bestimmt werden (Abb. 21).

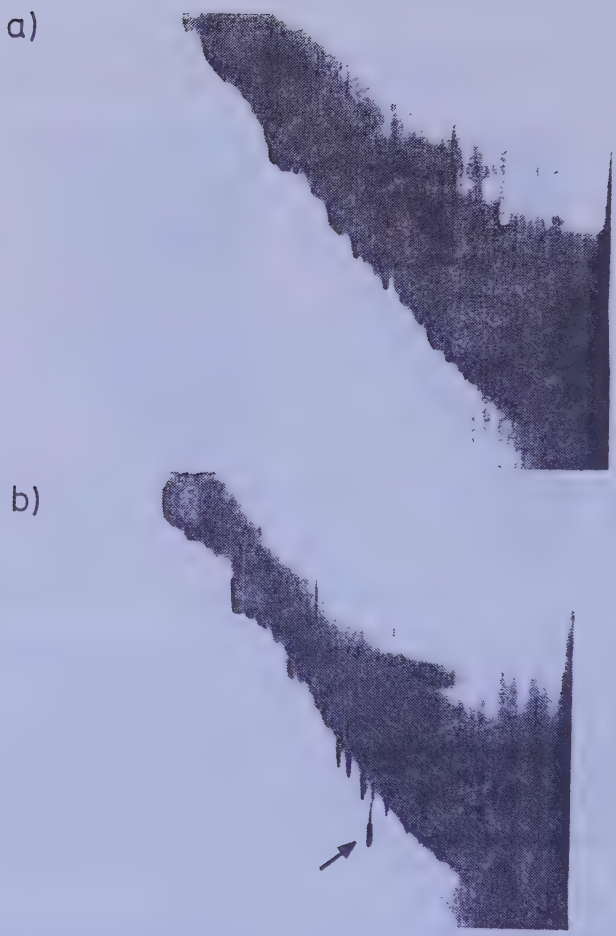

Abb. 19: Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Zellkern-Nukleinsäureextrakten unter den Bedingungen von Abb. 13. Auf dem Gel wurde jeweils die Nukleinsäure von $2 \cdot 10^6$ Zellkernen aus gesundem (a) und PSTV-infiziertem (b) Blattgewebe aufgetrennt. Der Pfeil bezeichnet die Position der zirkulären PSTV-Bande. Bei den darüberliegenden, ebenfalls leicht aus der Front herausfallenden Banden handelt es sich um die linearen Moleküle und möglicherweise um die intermediären Formen von Viroid

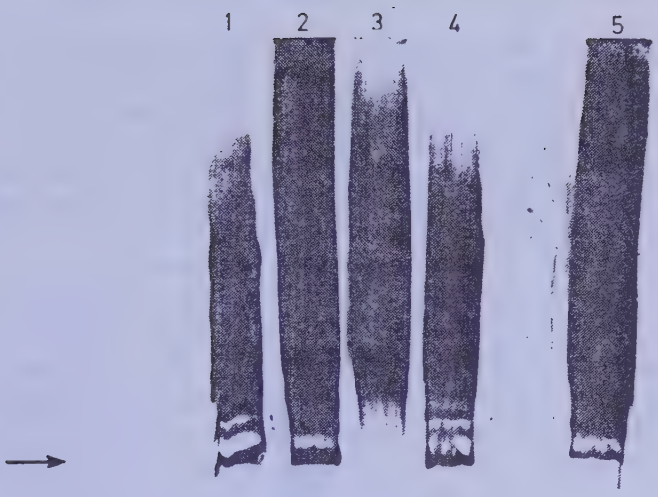

Abb. 20: Bidirektionelle Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Gewebe- und Zellkern-Nukleinsäureextrakten unter den Bedingungen von Abb. 14. Die Bahnen enthalten: Rohextrakt aus PSTV-infiziertem Gewebe (1,4), Nukleinsäureextrakt aus $2 \cdot 10^6$ Zellkernen aus PSTV-infiziertem (2,5) und gesundem (3) Gewebe. Die in Bahn 5 aufgetrennte Kernnukleinsäure stammte aus nur schwach infizierten Pflanzen. Die Position der zirkulären PSTV-RNA ist mit einem Pfeil markiert. Bei den in den infizierten Proben zusätzlich sichtbaren Banden handelt es sich um die linearen Moleküle

Hierzu wurde jeweils die Nukleinsäure von $2 \cdot 10^6$ Zellkernen zusammen mit Viroidkonzentrationsmarkern bidirektionell aufgetrennt. Es zeigte sich dabei, daß abhängig vom Infektionsgrad der Pflanzen, aus denen die Kerne ursprünglich isoliert worden waren, die Intensität der zirkulären Viroidbande in einem weiten Bereich schwankte. Bei sehr stark infiziertem Gewebe betrug die geschätzte Menge bis 4 ng, bei Pflanzen, denen die Krankheit noch nicht anzusehen war, 80 pg. Da auf die Gele jeweils die Nukleinsäuren von $2 \cdot 10^6$ Zellkernen aufgetragen worden waren und 2 ng $1 \cdot 10^{10}$ Viroid-Molekülen entspricht, errechnet sich die Kopienzahl, abhängig vom Infektionsgrad der Pflanzen, zu 200-10 000 Viroiden pro Zellkern.

Um die Viroidkonzentration in der Pflanze zu bestimmen, wurden die Nukleinsäuren 1. aus dem Filterrückstand der entsprechenden Zellkernisolierung extrahiert und 2. nach der Schnellmethode aus mehreren Blättern der Pflanzen, die für die dazugehörige Kernisolierung benutzt worden waren. In beiden Fällen wurde die Nukleinsäure bidirektionell aufgetrennt und die

Menge an Viroid auf dem Gel wie beschrieben bestimmt. Da jeweils die Ausgangsmenge an Blattgewebe bekannt war, konnte die Konzentration an Viroid-RNA in der Pflanze bestimmt werden und über den Zusammenhang, daß sich in 1 g Blätter $5 \cdot 10^8$ Zellen befinden (Brüggemann, 1982), die Kopienzahl pro Zelle errechnet werden. In beiden Fällen kamen die Werte ±10% an die im Zellkern gefundenen Kopienzahlen von 200-10 000 je nach Grad der Infektion heran.

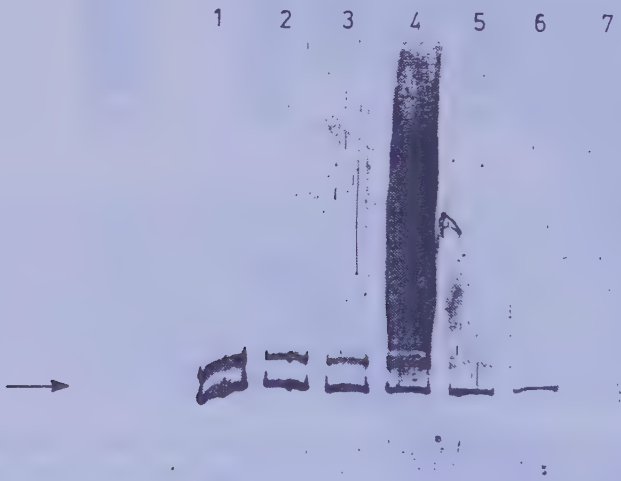

Abb. 21: Bidirektionelle Polyacrylamid-Gelelektrophorese von reiner Viroid-RNA und einem Zellkern-Nukleinsäureextrakt unter den Bedingungen von Abb. 14. Die einzelnen Bahnen enthalten: 30 ng (1), 9.5 ng (2), 3 ng (3), Nukleinsäureextrakt aus $2 \cdot 10^6$ Zellkernen (4), 1 ng (4), 0.3 ng (5), 0.1 ng (6). Durch Vergleich der Intensität der zirkulären PSTV-Bande (siehe Pfeil) wurde die Viroid-Menge in dem Nukleinsäureextrakt der Zellkerne in Bahn 4 auf 2 ng geschätzt

Diese Differenz von ±10% kann durchaus in der Methode begründet liegen. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, daß ein kleiner Teil der Viroide innerhalb der Zelle nicht in den Zellkernen, sondern im Cytoplasma oder den Organellen lokalisiert ist.

4.2. Nachweis der Viroide in Chloroplasten und Chromatin

Aufgrund der Fehlerbreite von ±10% in der Konzentrationsbestimmung der Viroide bleibt die Unsicherheit, ob wirklich 100% aller in der Zelle nachweisbaren Viroid-RNAs im Zellkern lokalisiert sind. Da das Cytoplasma in dem Sinne nicht isoliert werden kann, sollten wenigstens hochreine Chloroplasten aus infiziertem Gewebe auf Viroidgehalt hin überprüft werden. Da diese Organellen außerdem lange Zeit wegen der offensichtlichen Pflanzenspezifität der Viroiderkrankung im Verdacht standen, an der Vermehrung der Viroid-RNA beteiligt zu sein, erschien diese Überprüfung um so wichtiger.

Die Chloroplasten wurden nach der Vorschrift von Herrmann (1982) isoliert. Der letzte Schritt der Aufreinigung besteht in einer Saccharosezentrifugation. Dabei bandieren die Chloroplasten, während Kernüberreste, Membranteile, Stärkekörner u.s.w. sedimentieren. Abb. 22 zeigt die hochreinen Chloroplasten, einmal im Phasenkontrast und einmal im Fluoreszenzlicht. Außer den Organellen sind keine störenden Partikel zu erkennen.

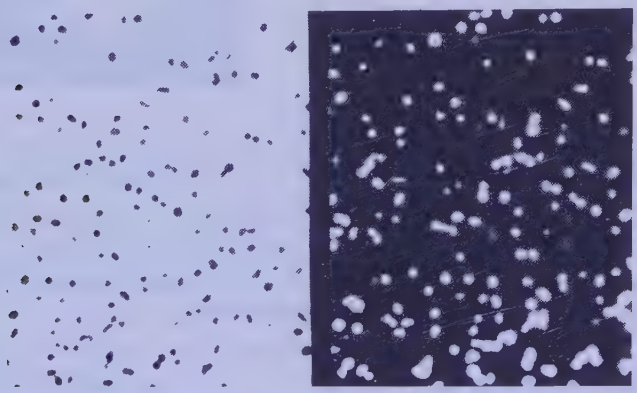

Abb. 22: Hochreine Chloroplastenfraktion. Sowohl die Phasenkontrast- (links) als auch die Fluoreszenzaufnahme (rechts) zeigen deutlich die Reinheit der Fraktion. Es sind nur Chloroplasten zu erkennen. Vergrößerung 300fach

Aufgrund der Pufferzusammensetzung verklumpen während der Chloroplastenisolierung die Zellkerne, lysieren und können über eine Saccharosekissen-Zentrifugation zusammen mit anderen Zelltrümmern abgetrennt werden. Abb. 23 zeigt dieses Sediment einmal als Phasenkontrastaufnahme und einmal im Fluoreszenzlicht. Deutlich ist das hochvernetzte Chromatingeflecht der lysierten Zellkerne zu erkennen.

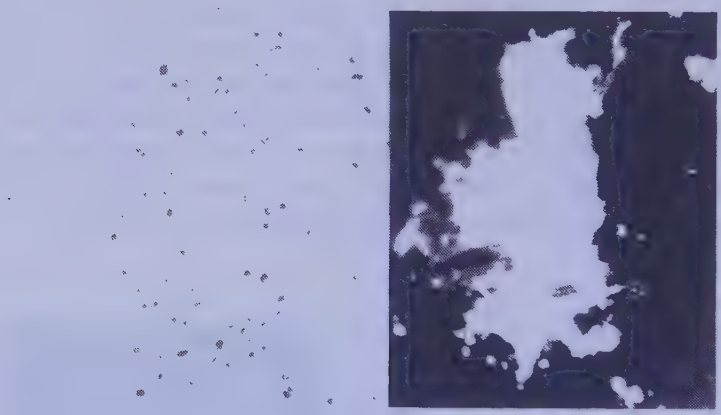

Abb. 23: Mikroskopisches Bild der Chromatin-reichen Fraktion, die während der Chloroplasten-Isolierung aus mit PSTV-infiziertem Blattgewebe anfiel. Vergrößerung 300fach
links: Phasenkontrastaufnahme. Deutlich sind zerstörte und verklumpte Chloroplasten, Stärkekörner und Zelltrümmer zu erkennen
rechts: Fluoreszenzaufnahme. Erst im Fluoreszenzbild wird deutlich, daß die im Phasenkontrastbild sichtbaren Partikel total von einem Chromatinnetzwerk umgeben sind

Die im vorigen Kapitel beschriebene Bestimmung der Viroidkonzentration lieferte 1 bis maximal 2 Kopien Viroid-RNA pro Chloroplast. Der bei weitem größte Teil der Viroidmoleküle wurde im Sediment nachgewiesen. Selbst wenn man die große Überzahl der Chloroplasten gegenüber den Zellkernen berücksichtigt, muß man die 1-2 Viroidkopien wohl als Verunreinigung der Chloroplastenfraktion mit aus den lysierten Zellkernen freigesetzter RNA betrachten.

Aufgrund der Kosedimentation der Viroid-Moleküle mit dem Chromatinnetz-

werk im oben beschriebenen Experiment stellte sich nun die Frage nach der Lokalisierung der Viroide innerhalb der Zellkerne. Sind die Viroide wirklich mit dem Chromatin assoziiert, oder wurden sie nur im sedimentierenden Chromatingeflecht der lysierten Zellkerne mitgerissen?

4.3. Nachweis der Viroide in den verschiedenen Zellkern-Komponenten

In der Literatur (Pederson, 1974) ist eine recht einfache Methode zur Fraktionierung der Komponenten von Rattenleber-Zellkernen beschrieben. Hierbei werden die isolierten Kerne kurz beschallt und über ein Saccharosekissen in RNPs und Chromatin sowie Nukleoli aufgetrennt. Die Fraktionierung mußte für den Fall der Tomatenzellkerne nur leicht, wie unter **Methoden** beschrieben, modifiziert werden. Es waren dabei folgende Punkte zu berücksichtigen:

1) Die isolierten Zellkerne mußten zunächst in Puffer E suspendiert werden, da eine direkte Aufnahme in Puffer RSB schon zur Lyse der Kerne führen kann.
2) Die Beschallung der Zellkernprobe zeigte bei 4 x 10 sec optimale Ergebnisse. Ein längeres Beschallen führte zur Zerstörung der bis dahin freigesetzten Nukleoli.
   Befanden sich noch Spuren von Percoll in der Kernlösung, so gelang es nicht, die Zellkerne mit ausreichender Ausbeute aufzubrechen. Es bildete sich ein regelrechtes Netzwerk aus, bestehend aus noch ganzen Zellkernen und bereits freigesetzten Bruchstücken, das keine weitere Trennung erlaubte.
3) Die Saccharosekissen-Sedimentation wurde in einer präparativen Ultrazentrifuge mit einem Programm für langsames Beschleunigen und Bremsen durchgeführt, um ein Vermischen der Lösungen zu verhindern.

Nach dieser Zentrifugation wurden, wie bereits erwähnt, 4 Fraktionen geerntet:

1) das in 1 ml Puffer 1 aufgenommene Sediment
2) das untere Drittel des Saccharose-Kissens
3) die oberen zwei Drittel des Saccharose-Kissens
4) die Grenzschicht zum Kissen hin mit der darüber befindlichen Lösung.

Aus allen Fraktionen wurde die Nukleinsäure extrahiert, bidirektionell aufgetrennt (Abb. 24) und, wie bei den Zellkernen beschrieben, der Gehalt an Viroid bestimmt. Diese Werte wurden jeweils mit den ermittelten Zahlen

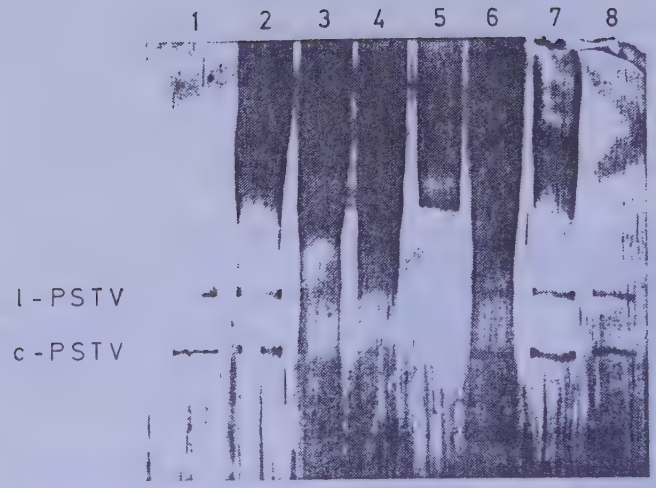

Abb. 24: Analyse der Viroid-Verteilung auf die subzellulären Fraktionen durch bidirektionelle Gelelektrophorese. Die verschiedenen Bahnen enthalten: 16 ng reine PSTV-RNA (1,8), Nukleinsäureextrakt von $2 \cdot 10^7$ Zellkernen aus infiziertem Blattgewebe (2, 7), die Lösung über dem Saccharose-Kissen mit der Grenzschicht (3), die oberen zwei Drittel des Saccharose-Kissens (4), das untere Drittel des Saccharose-Kissens (5), die das Sediment enthaltende Fraktion (6). Von der auf die verschiedenen Fraktionen verteilten Nukleinsäure aus $1 \cdot 10^8$ Zellkernen wurde jeweils 1/10 auf das Gel aufgetragen. Aus dem Vergleich der Viroid-Banden in Bahn 3, 4 und 6 geht hervor, daß etwa 90% der PSTV-RNA mit der Sediment-Fraktion assoziiert ist. Die Banden der zirkulären und linearen Moleküle der PSTV-RNA sind mit c-PSTV bzw. l-PSTV bezeichnet

für die dazugehörigen intakten Zellkerne, von denen vor der Beschallung der Probe ein Aliquot abgezweigt worden war, verglichen. Als Ergebnis wurde ermittelt:

1) Ungefähr 90% der vor der Zentrifugation in der Lösung nachgewiesenen Viroid-Moleküle können in der Sediment-Fraktion, nach Pederson der Nukleoli-Fraktion, wiedergefunden werden. Der Hauptteil der restlichen 10% läßt sich in der Fraktion, bestehend aus der Grenzschicht und der darüber befindlichen Lösung, nach Pederson der Chromatin und RNP enthaltenden Fraktion, nachweisen. Das stimmt auch mit dem Ergebnis überein, daß bei der Chloroplastenisolierung der bei weitem größte Teil der Viroid-RNA im Sediment nachgewiesen werden konnte. Zwar sind die Viroide

nicht direkt mit dem Chromatin assoziiert, wie aus der Fraktionierung der Komponenten des Zellkerns zu schließen ist, aber bei der Lyse der Kerne zur Chloroplastenisolierung wurden auch die Nukleoli freigesetzt bzw. im Chromatin-Netzwerk hängend absedimentiert.

2) Ein Umrechnen der in der Sediment-Fraktion berechneten Viroidmenge auf die in dieser Fraktion mikroskopisch auszählbaren Partikel (Abb. 25c) ergibt Kopienzahlen an Viroid-RNA zwischen 200-10 000, abhängig vom Infektionsgrad der Pflanzen. Die Werte zeigen, daß nicht nur die relative Verteilung der Viroide auf die Komponenten des Zellkerns bestimmt werden kann, sondern daß auch die Viroide quantitativ in den Komponenten wiedergefunden werden.

4.4. Überprüfung der Reinheit der Nukleoli-Fraktion

Die Identifikation des Sediments als Nukleoli-Fraktion sollte aber nicht nur auf die Übereinstimmung mit der Literaturvorschrift von Pederson gestützt werden, die für Rattenleber-Zellkerne ausgearbeitet worden war.

4.4.1. Mikroskopische Überprüfung der Nukleoli-Fraktion

Die mikroskopische Analyse der verschiedenen Fraktionen der beschallten Pflanzenkerne zeigte, daß, wie im Fall der Rattenleber-Zellkerne, das Sediment offensichtlich die Nukleoli enthielt, während das gescherte Chromatin von dem Zuckerkissen zurückgehalten wurde. Die Abb. 25a zeigt die beschallten Zellkerne vor der Fraktionierung. Im dazugehörigen Fluoreszenzbild waren kaum noch intakte Zellkerne zu erkennen. Abb. 25b zeigt die Fraktion über dem Zuckerkissen mit der Grenzschicht. In dem Fluoreszenzbild ist deutlich das gescherte Chromatin zu erkennen. Das dazugehörige Phasenkontrastbild zeigte praktisch keine Strukturen. Abb. 25c zeigt bei stärkerer Vergrößerung nicht fluoreszierende Partikel von 1-2 µm Durchmesser. Fluoreszierende Strukturen, wie man sie vom Chromatin erwarten würde, sind keine zu entdecken. Die Partikel wurden zur Viroid-Kopienzahl-Bestimmung ausgezählt.

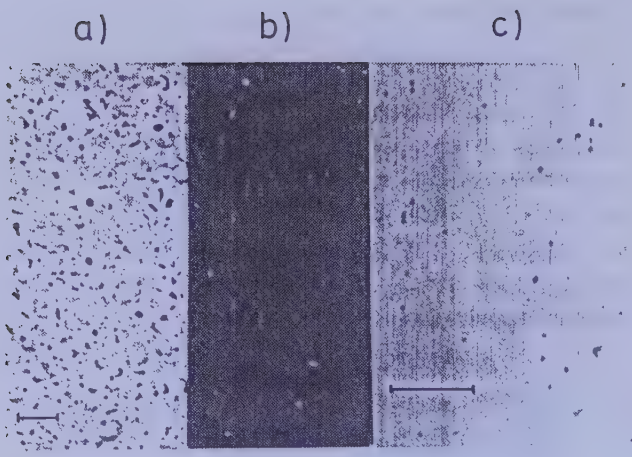

Abb. 25: Mikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Fraktionen beschallter Zellkerne aus PSTV-infiziertem Tomaten-Blattgewebe. Die beschallten Zellkerne sind als Phasenkontrastaufnahme gezeigt, um alle in der Fraktion vorhandenen Partikel sichtbar zu machen (a). Die Fraktion über dem Saccharose-Kissen zeigt im Fluoreszenzlicht das gescherte Chromatin (b). Die Nukleoli in der Sediment-Fraktion sind nur unter Phasenkontrast-Bedingungen sichtbar (c). Der Maßstab entspricht 20 µm

4.4.2. RNA/DNA Verhältnis der Nukleoli- und der Chromatin/RNP-Fraktion

Die Nukleinsäure aus der Chromatin- und der Nukleoli-Fraktion wurde extrahiert (siehe **Methoden**) und in der analytischen Ultrazentrifuge im Cs_2SO_4-Dichtegradientenlauf nach DNA und hochmolekularer RNA (MG $\geq$ 30 000) aufgetrennt. Abb. 26 zeigt ein solches Profil für die Nukleoli-Fraktion nach Erreichen der Gleichgewichtsbedingungen.

Das DNA/RNA-Verhältnis, also das Verhältnis der Peakflächen von DNA und RNA im Ultrazentrifugenprofil der Chromatin-Fraktion lag bei 25. Hier war ein RNA-Peak kaum auszumachen. Das Verhältnis in der Nukleoli-Fraktion dagegen betrug etwa 6. Mit anderen Worten ist der Anteil an RNA im Sediment um ein Vielfaches höher als in der Chromatin-Fraktion, ein Ergebnis, das man für die Nukleoli erwarten sollte. Dabei ist zu berücksichtigen, daß mit

dieser Technik RNA erst ab einem Molekulargewicht von 30 000 erfaßt wird, so daß der Gesamt-RNA-Gehalt noch wesentlich größer ist.

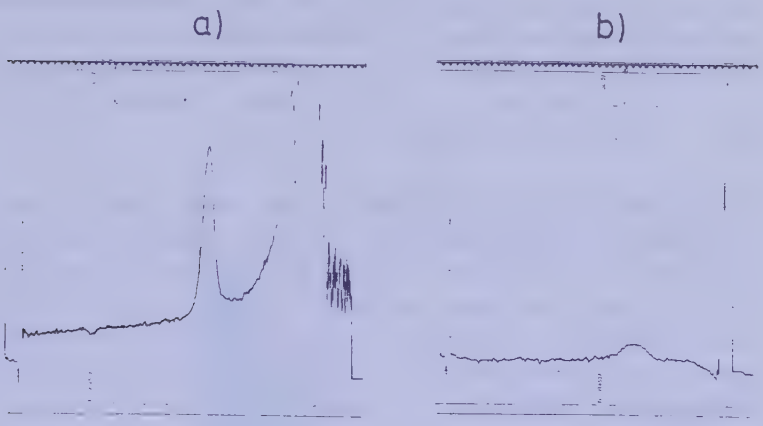

Abb. 26: Cs_2SO_4-Dichtegradientenlauf in der analytischen Ultrazentrifuge. Gezeigt ist die DNA- (a) und RNA-Verteilung (b) in der Sediment-Fraktion nach 24 h Zentrifugation bei 44 000 rpm und 20°C. Die Nukleinsäurekonzentration beträgt in jeder Zelle 0.05 A_{260}. Die mit Cs_2SO_4 eingestellte Ausgangsdichte betrug in (a) 1.4 g/ml und in (b) 1.61 g/ml. Das DNA/RNA-Verhältnis wurde durch Auswiegen der Peakflächen bestimmt und beträgt in diesem Fall 6

Der hohe RNA Anteil, das mikroskopische Erscheinungsbild sowie die hohe Sedimentationskonstante rechtfertigen wohl den Schluß, daß es sich bei den Partikeln im Sediment nach der Fraktionierung der beschallten Zellkerne tatsächlich um Nukleoli handelt. Da in dieser Fraktion auch der Hauptteil der Viroide nachgewiesen werden konnte und diese Fraktion außer den 1-2 µm großen Partikeln kaum andere Komponenten enthält, sind die Viroide offensichtlich mit den Nukleoli assoziiert. Damit ergibt sich folgendes Bild:

1) Bei den in der Sediment-Fraktion befindlichen Partikeln handelt es sich mit großer Sicherheit um Nukleoli.
2) Diese Nukleoli konnten hochrein isoliert werden.
3) Bei der Mengenbestimmung der Viroid-RNA in dieser Fraktion, bezogen auf

die ausgezählten Partikel bzw. Nukleoli, ergeben sich Kopienzahlen zwischen 200-10 000, abhängig vom Infektionsgrad der Pflanzen. Sie sind damit in den Fehlergrenzen vergleichbar mit den Werten, die für die intakten Zellkerne vor der Beschallung bestimmt wurden.

Damit ist wohl die Aussage erlaubt, daß der Großteil der in den Zellkernen lokalisierten Viroide mit den Nukleoli assoziiert ist.

4.5 Hochsalzlyse der Nukleoli

Die Assoziation der Viroid-RNA mit der Nukleoli-Fraktion läßt prinzipiell zwei Möglichkeiten molekularer Wechselwirkung zu: Viroid-Nukleinsäure-Wechselwirkungen oder Viroid-Protein-Wechselwirkungen. Wie aus der Literatur bekannt ist (Zieve und Penman, 1981), kann man mit Hochsalzpuffern die meisten der im Zellkern vorkommenden Nukleinsäure-Protein-Komplexe aufbrechen. Aus diesem Grund wurde das Nukleoli-Sediment in 1 ml des folgenden Puffers suspendiert:

500 mM NaCl
50 mM $MgCl_2$
10 mM Tris-HCl, pH 7.4

Die Suspension wurde 5 min stark geschüttelt und 1 h bei 45 000 rpm im Ti 55.2 Rotor (Beckman) bei 4°C abzentrifugiert. In der anschließenden bidirektionellen Gelelektrophorese konnte Viroid nur im Überstand nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Viroid-RNA im Nukleolus in einem Protein-Nukleinsäure-Komplex vorliegt. Zur exakteren Überprüfung der Ionenstärke-Abhängigkeit wurde das oben beschriebene Experiment in Puffern ausgeführt, die physiologische Konzentrationen an $MgCl_2$ und steigende Mengen an NaCl enthielten:

5 mM $MgCl_2$
20 mM Tris-HCl, pH 7.0
50, 100, 200, 300, 400 mM NaCl

Nach der Zentrifugation bei 45 000 rpm wurde der Überstand phenolisiert und die Nukleinsäure gefällt. Wie aus Abb. 27 ersichtlich, ist zwar bereits bei 50 mM NaCl Viroid nachweisbar, der Hauptteil wird allerdings erst

bei einer Behandlung mit 400 mM NaCl freigesetzt. In dem entsprechenden Sediment war keine Viroid-RNA nachweisbar. Diese Untersuchung stützt die bereits gemachte Vermutung, daß die Viroide im Nukleolus an Proteine komplexiert vorliegen. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Viroid-RNAs dort sterisch in Form eines Einschlußkomplexes festgehalten werden. Die Hochsalzbehandlung würde dann bewirken, daß sich lediglich die räumliche Struktur der Nukleoli ändert und so die Viroide aus deren Netzwerk freigesetzt werden könnten.

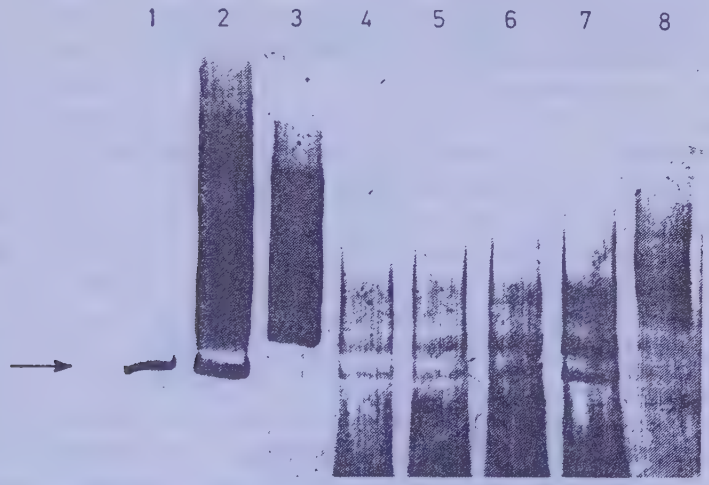

Abb. 27: Bidirektionelle Gelelektrophorese von salzbehandelten Nukleoli unter den Bedingungen von Abb. 14. Die Nukleoli aus $2 \cdot 10^7$ Zellkernen wurden in einem Puffer mit 50 mM (8), 100 mM (4), 200 mM (5), 300 mM (6) und 400 mM NaCl (7) stark geschüttelt, 1 h bei 45 000 rpm zentrifugiert und 1/10 der aus dem Überstand isolierten Nukleinsäure aufgetragen. Zum Vergleich sind 30 ng reine PSTV-RNA (1) sowie Nukleinsäurerohextrakt aus mit PSTV-infiziertem (2) und gesundem Gewebe (3) aufgetragen. Die Position der zirkulären PSTV-RNA ist mit einem Pfeil markiert

4.6. Rekonstitutionsversuche von Zellkernen mit Viroiden

Es kann also als gesichert angenommen werden, daß die Viroide innerhalb der Zellen zum größten Teil in den Nukleoli, und dort wahrscheinlich an

Proteine assoziiert, lokalisiert sind. Dadurch könnten sie auch vor dem Angriff von Nukleasen geschützt sein. Die Infektion des Gewebes, vielleicht auch die Ausbreitung der Viroide über die ganze Pflanze, erfolgt dagegen durch nackte RNA. Die Frage ist also, ob die Aufnahme der Viroide in die Zellkerne, die Orte ihrer Replikation, so schnell erfolgt, daß ihre Sekundärstruktur sie vor dem Angriff der zelleigenen Nukleasen genügend schützen kann.

Hierzu wurden je $6 \cdot 10^7$ isolierte Zellkerne aus gesunden Pflanzen mit jeweils 300 ng Viroid-RNA in 1 ml Puffer E unterschiedlich lange bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne abzentrifugiert, einmal mit Puffer E gewaschen, um eventuell außen an den Kernen haftende RNA zu entfernen, die Nukleinsäure isoliert und bidirektionell aufgetrennt. In der Abb. 28 sind von jeder Inkubationszeit drei Nukleinsäureverdünnungen aufgetragen. Die Auswertung der Ergebnisse ist in Abb. 29 dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min sind etwa 1/5 der von außen angebotenen Viroid-Moleküle im Zellkern nachweisbar, das sind 5000 Kopien pro Kern. Bis dahin erfolgt die Aufnahme offensichtlich exponentiell, wie sich aus der logarithmischen Auftragung ergibt (Abb. 29). Die Zeitkonstante errechnet sich aus der Steigung der Geraden mit etwa 8 min. Das bedeutet, daß nach 8 min 63% der maximal in die Zellkerne aufgenommenen Viroide - dem Wert bei 20 min - bereits in den Kernen nachweisbar sind. Die Eigenschaft, die Viroide aufzunehmen und festzuhalten, wird noch deutlicher, wenn man berücksichtigt, daß bereits nach 20 min Inkubation außerhalb der Zellkerne keine Viroid-RNA nachweisbar war, obwohl sich in den Kernen nur ein Teil der insgesamt angebotenen Moleküle befand. Die restlichen Viroid-RNAs waren offensichtlich abgebaut worden. Die maximal errechnete Kopienzahl von 5000 ist nicht sehr weit von den in vivo Daten stark infizierten Gewebes entfernt. Möglicherweise können z.B. aus molekularen Gründen nicht mehr als 5000 oder 10 000 Viroide pro Zellkern bzw. pro Nukleolus lokalisiert sein. Die Aufnahme selbst kann nach den vorliegenden Daten als rein passiver Transport angesehen werden, der keinen besonders komplizierten Mechanismus erfordert.

Ob solche Rekonstitutionsexperimente auch mit Nukleoli durchführbar sind und welche Proteine an einer Assoziation mit den Viroiden dort beteiligt sind, muß noch in Zukunft geklärt werden.

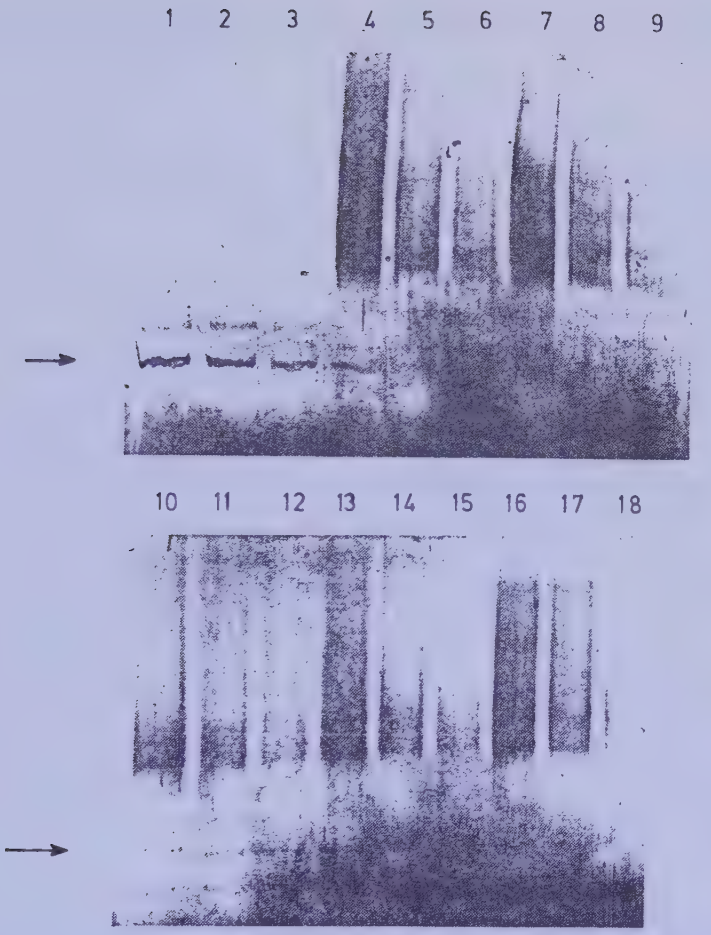

Abb. 28: Bidirektionelle Gelelektrophorese von Nukleinsäureextrakten aus gesunden Zellkernen, die unterschiedlich lange mit Viroid-RNA inkubiert worden waren, unter den Bedingungen von Abb. 14. Jeweils $6 \cdot 10^7$ Zellkerne wurden 2 min (4,5,6), 5 min (7,8,9), 10 min (10,11,12), 20 min (13,14,15) und 40 min (16,17,18) mit je 300 ng PSTV-RNA inkubiert. Von der aus den Zellkernen extrahierten Nukleinsäure wurde 1/80 (4,7,10,13,16), 1/160 (5,8,11,14,17) und 1/320 (6,9,12,15,18) auf das Gel aufgetragen. Als Referenz dienten 2.6 ng (1), 1.3 ng (2) und 0.7 ng (3) reine PSTV-RNA. Die Viroid-Konzentration in den einzelnen Proben wurde über Vergleich der Bandenintensitäten mit der Referenz, bzw. über die Nachweisempfindlichkeit der Silberfärbung von 80 pg für Viroid-RNA bestimmt. Die Position der zirkulären PSTV-RNA ist durch einen Pfeil markiert

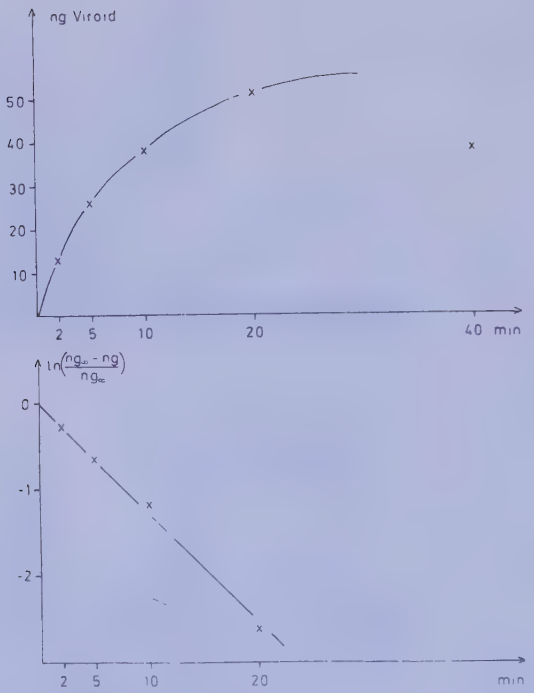

Abb. 29: Kinetik der Aufnahme von Viroid in gesunde Zellkerne. Zugrunde liegt die Auswertung der Gele aus Abb. 28. Deutlich ist der exponentielle Abfall der Viroidaufnahme mit der Zeit zu erkennen. Der Rückgang der Viroidmenge bei 40 min ist wahrscheinlich auf Degradation zurückzuführen. Die Zeitkonstante für den exponentiellen Bereich beträgt ungefähr 8 min, d.h. nach 8 min befinden sich 63% der maximal 55 ng Viroid in den Zellkernen. Bezogen auf die $6 \cdot 10^7$ angebotenen Zellkerne bedeutet das, daß maximal eine Kopienzahl von ungefähr 5000 erreicht wurde

5. Anwendung der zweidimensionalen Elektrophorese auf das Problem des "Waldsterbens"

5.1. Einleitung

In den letzten Jahren war bei bestimmten Krankheiten, nicht nur pflanzlichen, immer wieder der Verdacht geäußert worden, sie könnten eventuell auf Viroidbefall zurückzuführen sein. Mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten zweidimensionalen Gelelektrophorese eröffnete sich ein Weg, verschiedenste Gewebe sehr schnell auf Viroidinfektionen zu testen. So konnte erst vor kurzem von uns gezeigt werden, daß eine bestimmte Erkrankung an Rebstöcken nicht, wie lange Zeit vermutet (Sänger, Nienhaus, persönliche Mitteilungen), von Viroiden hervorgerufen wird.

Weitere Objekte unserer Untersuchungen stellten vom sogenannten "Waldsterben" betroffene Bäume dar. Die unter diesem Begriff zusammengefaßten Krankheitssymptome werden in den letzten Jahren in Mitteleuropa immer häufiger beobachtet. Laut Aussagen der Bundesregierung sind mittlerweile in Deutschland fast 50% des Waldes erkrankt und die Bäume z.T. bereits abgestorben. Trotz verstärkter Forschung auf diesem Gebiet ist der Grund für diese Art der Erkrankung noch nicht bekannt. Die meisten Untersuchungen bemühen sich um eine Korrelation zwischen Luftverschmutzung und "Waldsterben". Hauptsächlich der saure Regen, hohe Ozonkonzentrationen und Photooxidationsprodukte in der Atmosphäre werden als Verursacher diskutiert (Salzwedel, Hrsgb., 1983). Gerade in letzter Zeit wird aber auch immer öfter auf die epidemiologischen Aspekte des "Waldsterbens" hingewiesen (Nienhaus, 1975; Braun und Fink, 1978; Nienhaus, 1979) und eine mögliche Beteiligung von Viren und verwandten Infektionen diskutiert (Kandler, 1983).

Der Verdacht, der nicht nur innerhalb unseres Arbeitskreises geäußert wurde, daß das "Waldsterben" von Viroiden hervorgerufen werden könnte, stützte sich neben den schon erwähnten epidemiologischen Aspekten hauptsächlich auf zwei Tatsachen:

1) Das Bild der nach Viroidbefall abgestorbenen Kokosplantage auf den Philippinen (Abb.1) erinnert doch sehr an geschädigte Waldbestände in Deutschland (Abb. 30).
2) Die Sommer der letzten Jahre, in denen das "Waldsterben" immer bedrohlichere Formen annahm, waren sehr heiß und trocken, ein Klima, das die Vermehrung der Viroide begünstigt.

Da wir mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese die Technik besaßen,

auch bis dahin unbekannte Viroide schnell und hochempfindlich nachzuweisen und außerdem eine langjährige Erfahrung mit Nukleinsäureextraktionen aus den verschiedensten pflanzlichen Geweben existierte, lag es nahe, Proben erkrankter Bäume auf Viroidbefall hin zu testen.

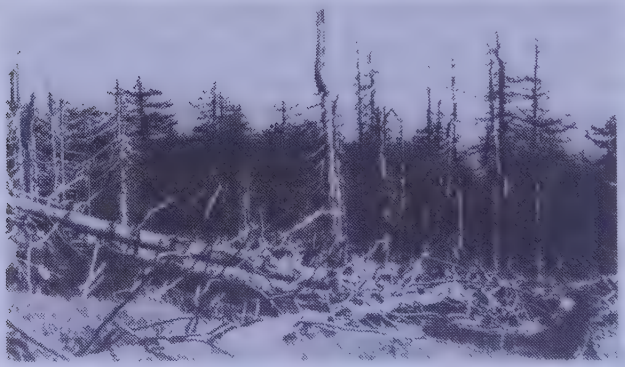

Abb. 30: Vom "Waldsterben" betroffener, abgestorbener Fichtenbestand

5.2. Probenaufbereitung

Im August 1983 wurden nach einer längeren Trockenperiode in für das "Waldsterben" signifikanten Gegenden Nordrhein-Westfalens sowohl von Gymnospermen (Kiefer, Fichte) als auch von Angiospermen (Buche) verschiedene Blatt- und Nadelproben genommen. Die drei Sammelstellen Dämmerwald (I), Buke im Eggegebirge (II) und Velbert im Ebbegebirge (III) unterschieden sich sowohl in ihrer geographischen Höhe als auch in ihrer Lage zu den nächsten Industrieballungszentren (Abb. 31). Unter Mithilfe der örtlichen Forstämter wurden zusammen mit Dipl. Ing. Kassebohm und Dr. Bewerunge vom Umweltreferat der Stadtwerke Düsseldorf die zu untersuchenden Bäume ausgesucht. Von den insgesamt 25 gesammelten Proben wurden von den ortsansässigen Förstern nur 4 als gesund eingestuft, die restlichen als krank oder

kränkelnd.

Abb. 31: Plan der Probensammelstellen mit ihren geographischen Höhen
I. Dämmerwald; II. Eggegebirge; III. Ebbegebirge

Von den ausgesuchten Bäumen wurden jeweils etwa 100 g Blätter oder Nadeln abgeerntet. Dabei wurden im Falle einer Erkrankung solche Stellen ausgesucht, die die Symptome besonders deutlich zeigten. Die frisch geschnittenen Proben wurden an Ort und Stelle in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf Trockeneis ins Institut transportiert und dort bei -70°C bis zum Aufschluß des Pflanzengewebes gelagert. Die Extraktion der Nukleinsäure erfolgte wie unter **Methoden** beschrieben. Durch das Abwaschen der Blätter und Nadeln mit Aceton wurde das Eindringen des Extraktionspuffers ins Pflanzengewebe erleichtert.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese mußte zum Auftrennen der Nukleinsäuren aus Bäumen modifiziert werden. Aufgrund des hohen Anteils an Harzen, Polyphenolen und anderen sekundären Pflanzenstoffen war weder eindimensional noch nach der oben beschriebenen zweidimensionalen Elektrophorese auf den Gelen auch nur eine einzige Bande zu erkennen. Sobald die Matrix bei der Silberfärbung mit der Entwicklerlösung in Berührung kam, wurde sie

schwarz. Offensichtlich enthielten die Proben Substanzen, die über die Gele verschmierten und sich sehr schnell und intensiv färbten. Um die Nukleinsäure bzw. die RNA reiner zu erhalten, wurden verschiedene Homogenisations- und Extraktionsmethoden, sowie mehrere Fraktionierungstechniken wie Hochsalz- oder CTAB-Fällungen, Cs_2SO_4-Gradientenzentrifugation, Hydroxylapatit-Chromatographie und enzymatische Verdauungen ausprobiert. All diese Versuche blieben ohne Erfolg. Entweder zeigten die Gele immer noch die dunkle Hintergrundfärbung, oder die Nukleinsäuren waren zusammen mit dem Schmutz weggereinigt worden. Erst ein Austausch der Elektrophoresebedingungen, d.h. in der 1. Dimension wurden die Proben statt nativ denaturierend und in der 2. Dimension nativ anstelle denaturierend aufgetrennt, brachte den gewünschten Erfolg. Dabei lief die Elektrophorese in beiden Richtungen bei 225 V, wobei die 1. Laufrichtung abgestoppt wurde, wenn der Farbstoff Bromphenolblau gerade aus der Gelmatrix herauswanderte. Danach wurde der ausgeschnittene Gelstreifen 2 x 10 min in Elektrophoresepuffer gewaschen, um den Harnstoff zu entfernen, und dann einpolymerisiert. Unter den nativen Laufbedingungen der 2. Dimension wurden die Proben dann noch 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbeschritte erfolgten wie unter Methoden beschrieben. Bei der Gelelektrophorese unter diesen umgedrehten Bedingungen schmierten die störenden Substanzen nicht über die ganze Laufstrecke, sondern sammelten sich denaturierend im Bereich der 5S RNA an und liefen nativ etwas langsamer als die RNAs. Damit lagen sie also gerade neben der Nukleinsäurefront und die Gele waren gut auswertbar. Die Abb. 32 und 34-36 zeigen solche zweidimensionalen Gelelektrophoresen von Baumproben. Die Nukleinsäuren sind entlang einer Diagonalen angeordnet. Aufgrund der Unempfindlichkeit der Banden gegenüber DNase-Behandlung und ihres Verschwindens bei alkalischer Hydrolyse muß davon ausgegangen werden, daß es sich um RNAs handelt. Nur im oberen Bereich, bei Molekulargewichten größer als 10^6, sind wegen Überladung und fehlender Trennleistung der Gele die Banden nicht mehr aufgelöst; im Bereich von 25 000 (tRNA)-10^6 dagegen sind sie sauber getrennt und gut auswertbar.

5.3. Keine Hinweise auf Viroide in erkrankten Bäumen

Um das Laufverhalten von Viroiden in dem umgedrehten zweidimensionalen Gelsystem kennenzulernen, wurde zu gesundem Nukleinsäureextrakt aus Rotbuche saubere Viroid-RNA zugesetzt. Wie aus Abb.32 ersichtlich, fällt

diese deutlich aus der Front der anderen Nukleinsäuren heraus. Eine solche Bande konnte in keiner der 25 untersuchten Baumproben gefunden werden. Da pro Gel die Nukleinsäure von 0.1 g Nadeln oder Blättern aufgetrennt wurde mit einer Nachweisempfindlichkeit für die Viroid-RNA von mindestens 100 pg, bedeutet das, daß mehr als 10 Viroidmoleküle pro Zelle hätten entdeckt werden müssen, vorausgesetzt, daß 1 Gramm Pflanzengewebe aus Buchen genausoviele Zellen enthält wie bei der Tomate ausgezählt wurden. Wird diese Zahl mit den 10 000 Kopien, die bei stark befallenen Tomaten pro Zelle vorliegen, verglichen, so bedeutet das, daß noch eine sehr schwache Viroidinfektion hätte nachgewiesen werden können. Damit kann praktisch ausgeschlossen werden, daß das Baumsterben auf Viroidbefall zurückzuführen ist.

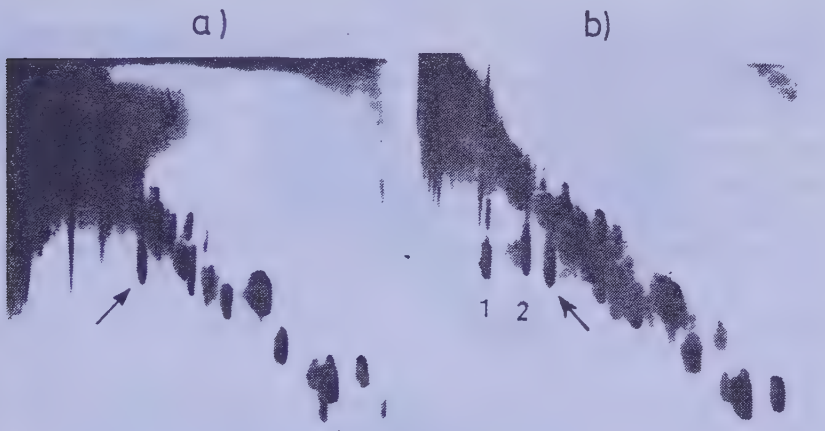

Abb. 32: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Nukleinsäurerohextrakten aus Buche zum Test auf Viroid-RNA. Das RNA-Muster ist vor (a) und nach (b) Zugabe von 40 ng PSTV-RNA gezeigt. Die Elektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in horizontaler Richtung bei 225 V solange, bis der Farbstoffmarker Bromphenolblau gerade aus der Gelmatrix herauswanderte. Nach Waschen des ausgeschnittenen Gelstreifens für 2x10 min in Elektrophoresepuffer wurden die Proben unter nativen Bedingungen vertikal bei 225 V für 90 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Pfeile zeigen auf eine Bande, die etwas aus der diagonalen Front der übrigen Nukleinsäuren herausfällt, aber deutlich von dem zirkulären (1) und linearen (2) Viroid getrennt ist

Die in Abb. 32 mit dem Pfeil markierte Bande ist in allen untersuchten Laubbäumen , ob krank oder gesund, nachweisbar, ebenso wie in Tomaten, Spinat, Tabak und Weinpflanzen. In den extrahierten Nukleinsäuren isolierter Tomatenzellkerne oder -chloroplasten ist diese RNA nicht zu finden. Sie ist also wohl cytoplasmatischer Natur und fällt aufgrund einer besonders ausgeprägten Struktur aus dem Bandenmuster der anderen RNAs heraus. Da sie bei krankem und gesundem Gewebe auftritt, hat sie mit einer Infektion nichts zu tun.

5.4. Krankheitsassoziierte RNAs

5.4.1. Nukleinsäuremuster von Kiefern

Nachdem durch die Umkehrung der beiden Dimensionen der zweidimensionalen Gelelektrophorese der störende Hintergrund von der Nukleinsäurefront entfernt werden konnte, war es möglich geworden, Bande für Bande der gesunden und kranken Proben zu vergleichen und zuzuordnen.

Abb. 33 zeigt Kiefernzweige von gesunden, kränkelnden und kranken Bäumen, aus deren Nadeln die Nukleinsäure extrahiert und zweidimensional auf-

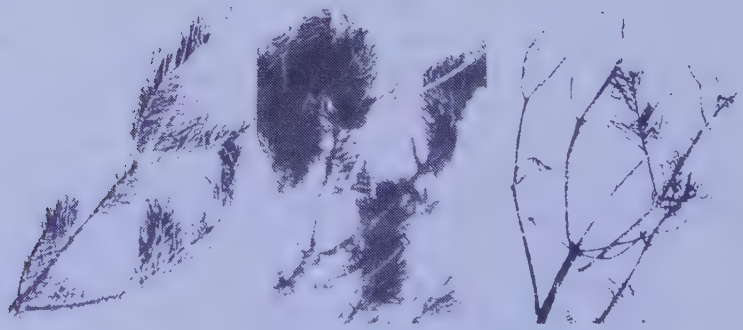

Abb. 33: Kiefernzweige von gesunden (a), kränkelnden (b) und kranken (c) Bäumen. Die Zweige wurden aus dem oberen Drittel der Bäume entnommen. Deutlich erkennbar ist der von (a) nach (c) steigende Nadelverlust

getrennt wurde (Abb. 34). Im Unterschied zur gesunden Probe enthalten dabei die Gele der beiden anderen Extrakte eine zusätzliche Bande, deren Intensität klar mit der Stärke der Symptome korreliert ist. Ansonsten sind die Nukleinsäuremuster identisch. Das oben gezeigte Beispiel stammte von etwa 35 Jahre alten Bäumen der Sammelstelle I auf Abb. 31. Die gefundene zusätzliche Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht zwischen 150 000 - 200 000 ließ sich auch in Kiefernextrakten der anderen Fundstellen nachweisen.

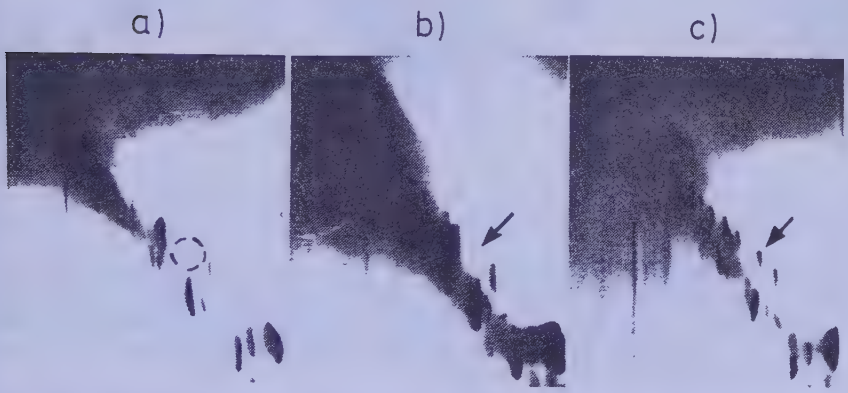

Abb. 34: Zweidimensionale Gelelektrophorese unter den Bedingungen von Abb. 32 von Nukleinsäurerohextrakten der gesunden (a), kränkelnden (b) und kranken (c) Kiefernzweige aus Abb. 33. Die Pfeile zeigen auf eine Bande, deren Intensität korreliert ist mit der Stärke der Krankheitssymptome, und die in gesundem Gewebe fehlt (gestrichelter Kreis)

5.4.2. Nukleinsäuremuster von Fichten

Ein ähnliches Ergebnis wie bei Kiefern konnte auch bei Fichten gefunden werden (Abb. 35). In Nukleinsäureextrakten von erkrankten, an der Oberseite vergilbten Nadeln tritt wiederum im Molekulargewichtsbereich zwischen 150 000 und 200 000 eine zusätzliche Bande auf. Ihre Nachweisbarkeit ist unabhängig vom Alter und Standort der Bäume. Ansonsten unterscheiden sich

die beiden Proben nur in den Intensitäten einzelner Banden, die nicht weiter untersucht wurden.

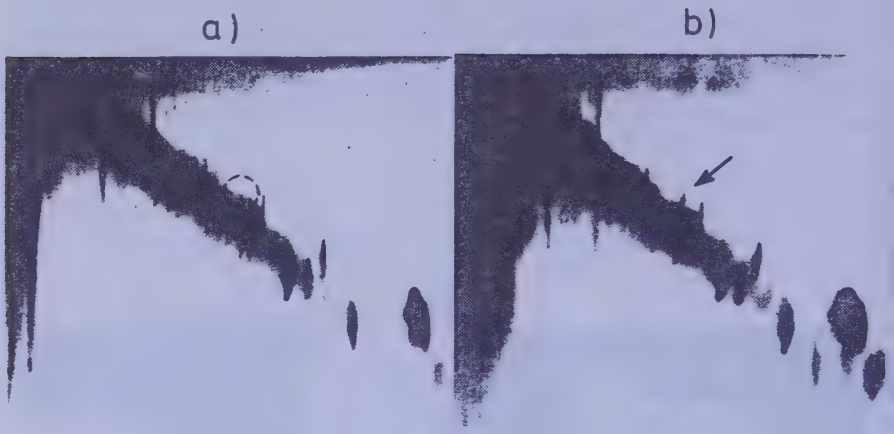

Abb. 35: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Nukleinsäurerohextrakten aus gesunden (a) und kranken (b) Fichtennadeln unter den Bedingungen von Abb. 32. Die zusätzliche Bande in der kranken Probe ist durch den Pfeil, ihr Fehlen in dem gesunden Gewebe durch den gestrichelten Kreis markiert

5.4.3. Nukleinsäuremuster von Buchen

Auch in isolierten Nukleinsäuren erkrankter Buchenblätter ist eine zusätzliche Bande im Vergleich zu gesunden klar erkennbar (Abb. 36). Weiterhin tritt dort aber noch eine Bandenverschiebung in Richtung zu größeren Molekulargewichten auf. Wiederum sind die Unterschiede im Nukleinsäuremuster weder altersabhängig - die untersuchten Bäume waren zwischen 10 und 160 Jahre alt - noch standortbedingt. Sie liegen in demselben Molekulargewichtsbereich wie bei Fichten und Kiefern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit Hilfe der "umgedrehten" zweidimensionalen Gelelektrophorese im Nukleinsäuremuster erkrankter Bäume aus vom "Waldsterben" betroffenen Gebieten im Molekulargewichtsbereich zwischen 150 000 - 200 000 zusätzliche Banden nachgewiesen werden konnten. Im

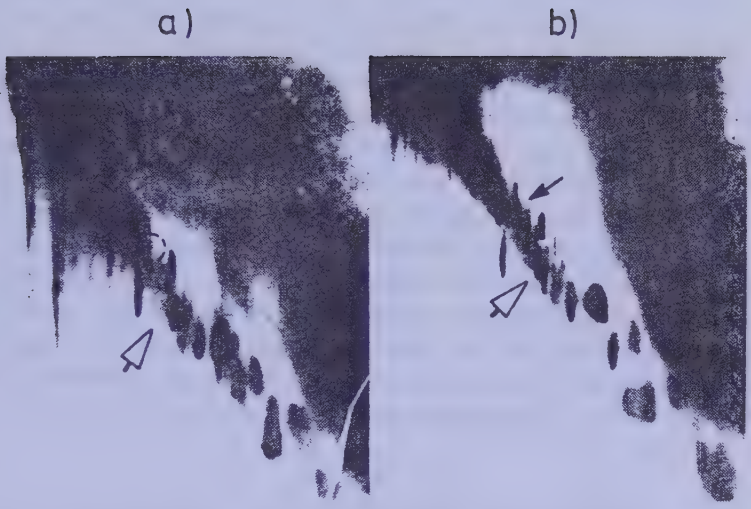

Abb. 36: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Nukleinsäurerohextrakten aus gesunden (a) und kranken (b) Buchenblättern unter den Bedingungen von Abb. 32. In der kranken Probe ist eine zusätzliche Bande zu sehen (geschlossener Pfeil), die in dem gesunden Gewebe fehlt (gestrichelter Kreis). Der offene Pfeil markiert einen Bereich, in dem eine Bandenverschiebung von einer Position mit geringerem Molekulargewicht (gesunde Probe) zu einer mit höherem Molekulargewicht (kranke Probe) stattgefunden hat

Fall der Kiefern konnte die Bandenintensität korreliert werden mit der Symptomstärke der Erkrankung. Das Auftauchen der Banden ist dabei vom Alter und Standort der geschädigten Bäume unabhängig. Weitere Unterschiede in der Intensität vergleichbarer Banden sind vorhanden, wurden aber nicht weiter untersucht. Zusätzliche oder fehlende RNAs im Molekulargewichtsbereich größer 10^6 können aufgrund der dort vorhandenden mangelnden Trennleistung des vorgestellten Gelsystems nicht identifiziert werden.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, über hochrein isolierte Zellkerne aus PSTV-infizierten Tomatenpflanzen die Lokalisierung der Viroide innerhalb der Zelle aufzuklären. Hierzu war die Entwicklung eines Gelelektrophoreseverfahrens notwendig, das konsequent die bekannten physikochemischen Eigenschaften der Viroide zu deren qualitativem und quantitativem Nachweis ausnutzt. Aufgrund der molaren Konzentration an Viroid-RNA sowie der Ionenstärkeabhängigkeit der Bindung in den entsprechenden Fraktionen können Aussagen über die wechselwirkenden Moleküle gemachtwerden. Die Leistungsfähigkeit des neuentwickelten Gelelektrophoreseverfahrens konnte am Beispiel mehrerer Nukleinsäureextrakte von Baumproben, die aus vom "Waldsterben" stark betroffenen Gebieten stammten, gezeigt werden.

6.1. Entwicklung eines neuen Gelelektrophoreseverfahrens

Von den methodischen Entwicklungen ist die Zellkernisolierung bereits im Ergebnisteil eingehend diskutiert worden und braucht damit nicht noch einmal behandelt zu werden.

Die Entwicklung der zweidimensionalen und bidirektionellen Gelelektrophorese stellt keine rein empirische Optimierung dar, sondern eine konsequente Ausnutzung der bekannten physikochemischen Eigenschaften der Viroide. Sie machte erst die quantitativen Aussagen über die zelluläre Verteilung der Viroid-RNA möglich. Bereits in anderen veröffentlichten Beispielen zur zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden Unterschiede in der Konformation und damit Änderungen in der elektrophoretischen Beweglichkeit zwischen nativen und denaturierenden Bedingungen zur Trennung der Nukleinsäure ausgenutzt (De Wachter und Fiers, 1982; Burckhardt und Birnstiel, 1978; Vigne und Jordan, 1971; Fischer und Lerman, 1979). Viroide sowie Virusoide dagegen erfahren eine ganz besondere Konformationsänderung. Der kovalent geschlossene einzelsträngige RNA-Ring geht von der hoch basengepaarten Stäbchenform, die er unter nativen Bedingungen einnimmt, in den offenen Ring über, der keine oder nur geringe Basenpaarung bei denaturierenden Bedingungen zeigt. Diese Fähigkeit der offenen Ringbildung ist bisher nur von Viroiden und Virusoiden bekannt und erlaubt dadurch eine klare Unterscheidung der Viroid-RNA von normaler zellulärer RNA und DNA. Die zirkuläre RNA

läuft in denaturiertem Zustand in der Gelelektrophorese erheblich langsamer als andere Nukleinsäuren vergleichbaren Molekulargewichts. Das hat zur Folge, daß sowohl bei der zweidimensionalen als auch bei der bidirektionellen Gelelektrophorese die Viroide und Virusoide deutlich abgesetzt von den übrigen Nukleinsäuren laufen. Die in sehr rohen Proben vorhandenen Polyphenole und sonstigen sekundären Pflanzenstoffe, die bei der Silberfärbung ebenfalls geschwärzt werden und eine Auswertung unmöglich machen können, fallen zwar mit einigen der zellulären Nukleinsäuren, nicht aber mit den Viroiden und Virusoiden zusammen. In der Praxis sieht es so aus, daß bei zweidimensionalen Gelen die zellulären Nukleinsäuren wegen ihrer groben Strukturhomologie eine etwa diagonal verlaufende Front bilden, aus der die eine oder andere Bande leicht herausfällt, daß aber die Viroid- und Virusoid-RNAs sehr deutlich neben der Diagonalen liegen. Bei bidirektionellen Gelen ist meist nur ein verschmierter Bereich zu sehen und, davon 1-2 cm abgesetzt, je nach Laufzeit der Elektrophorese, die zirkuläre RNA. Manchmal ist sehr dicht an der Diagonalen oder bei zweidimensionalen Gelen in Verlängerung der Viroid-RNA zur Front der übrigen Nukleinsäuren noch eine zweite Bande zu sehen. Hierbei handelt es sich um die in allen Proben vorkommenden, an einer einzigen Stelle geschnittenen Viroide. Unter nativen Bedingungen sind sie nicht von den zirkulären Molekülen zu unterscheiden. Erst beim Aufschmelzen der Struktur trennen sie sich von den ringförmigen RNAs und ähneln dann im Laufverhalten den zellulären Nukleinsäuren. Durch geeignete Wahl der Laufbedingungen gelingt es sogar, die thermodynamisch nicht so stabilen Virusoide bereits in die offene Ringstruktur zu überführen und sie so in der zweidimensionalen Gelelektrophorese von den noch als Stäbchen laufenden Viroiden zu unterscheiden.

Da die Technik prinzipiell zirkuläre Moleküle nachweisen kann, würden natürlich auch zelleigene ringförmige RNAs aus der Front der übrigen zellulären Nukleinsäuren herausfallen. Solche RNA-Ringe unterschiedlicher Größe wurden auch auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Extrakten aus Hela-Zellen und Physarum polycephalum beobachtet (Hsu und Coca-Prados, 1979), sind aber von Pflanzen bisher nicht bekannt.

Die beiden Techniken, die zweidimensionale sowie die bidirektionelle Gelelektrophorese, ergänzen sich z.B. beim Test auf Viroidbefall hervorragend. Erstere ist dazu geeignet, Viroide unbekannter Sequenz zu identifizieren, allein aufgrund des im Vergleich zu anderen Nukleinsäuren strukturell bedingten außergewöhnlichen Laufverhaltens. Die bidirektionelle Elektrophorese erlaubt dann, aufgrund dieser Kenntnis, Reihenuntersuchungen

z.B. von Saatgut auf Befall mit genau diesem Viroid durchzuführen.

Vergleicht man die oben beschriebenen Techniken mit anderen Viroid-Nachweistests, so hat man Empfindlichkeit, Schnelligkeit und Einfachheit der Bedienung zu betrachten.

Die zweidimensionale wie auch die bidirektionelle Gelelektrophorese haben in Verbindung mit der bei uns benutzten Silberfärbung eine Nachweisempfindlichkeit von 80 pg für Viroid-RNA, unabhängig von der Konzentration des Krankheitserregers sowie der sonstigen Verunreinigungen in der Probe. Die Nachweisgrenze von 5-10 Kopien an Viroid-RNA pro Zelle ist nur bedingt durch die Löslichkeit des Rohextraktes im Gelpuffer. Durch vorgeschaltete Fraktionierungsschritte, die allerdings Zeit kosten, sollte es leicht möglich sein, die Viroidfraktion konzentrierter aufzunehmen und damit Viroidinfektionen in einem noch viel früheren Stadium mit wesentlich geringeren Kopienzahlen nachweisen zu können. Damit wird sich der Test zwar nicht mit den hochaktiven M13 Hybridisierungen messen können, ist aber empfindlicher als die früher beschriebenen Hybridisierungstests mit in pBR 322 klonierter Viroid-cDNA (Owens und Diener, 1981) sowie die mittlerweile käuflichen Antikörpertests gegen an Viroid-cDNA-Vektor gekoppelte Antigene.

Der Zeitaufwand für den hier entwickelten Test liegt erheblich unter dem für alle anderen veröffentlichten Viroid-Nachweisverfahren. Vom Ernten des Pflanzenmaterials bis zum entwickelten Gel werden weniger als 8 Stunden benötigt. Im Vergleich dazu erfordert die Hybridisierungstechnik 4 Tage (Owens und Diener, 1981), Nukleinsäure-Fingerprints sowie Bioassays dauern noch länger. Das Fehlen jeglicher Radioaktivität vereinfacht außerdem das Diagnoseverfahren. Alle Materialien und Geräte sind kommerziell erhältlich. Mit Hilfe der bidirektionellen Gelelektrophorese können leicht, unter Benutzung eines geeigneten Gelkamms, 20 Proben gleichzeitig untersucht werden.

Da der hier beschriebene Test nur von der Struktur der Viroide und Virusoide abhängt, ist er generell für alle Typen dieser RNAs einsetzbar. Aus diesem Grund stellt er eine gute Ergänzung zur molekularen Hybridisierung dar. Während diese nur spezielle Sequenzen unabhängig von der Struktur erkennen kann, können mit der beschriebenen Gelelektrophoresetechnik Strukturen ohne Rücksicht auf Sequenzen nachgewiesen werden.

Zur Zeit wird mit gutem Erfolg versucht, die bidirektionelle Gelelektrophorese weiter zu vereinfachen und zu beschleunigen, sowie bei den Schnellaufschlüssen für diese Tests auf das toxische Phenol zu verzichten.

6.2. Verteilung der Viroide in den Pflanzenzellen

In der Vergangenheit wurde von den verschiedensten Autoren immer wieder eine mögliche Lokalisierung der Viroide innerhalb der Zellkerne diskutiert (Diener, 1971; Sänger, 1972; Takahashi und Diener, 1975; Semancik et al., 1976; Flores und Semancik, 1982; Takahashi et al., 1982). Dieses Ergebnis war allerdings nie ganz zweifelsfrei, da die Untersuchungen nur an grob angereicherten Zellkernfraktionen durchgeführt worden waren. Die in dieser Arbeit vorgestellte Isolierungsmethode dagegen liefert hochreine Zellkerne in solchen Mengen, daß quantitative Untersuchungen möglich wurden. Es zeigte sich dabei, daß praktisch alle in der Zelle nachweisbaren Viroide in den Zellkernen wiedergefunden werden können. Die Kopienzahlen betragen, abhängig vom Infektionsgrad der Pflanzen, 200-10 000 pro Zelle bzw. pro Zellkern. Da es sich hierbei um Durchschnittswerte handelt, kann die Viroidkonzentration in einzelnen Zellen bzw. Zellkernen durchaus noch höher liegen.

Obwohl der Hauptanteil an Viroid-RNA in den Zellkernen nachgewiesen werden konnte, kann ehrlicherweise nicht ausgeschlossen werden, daß sich bis zu 10% des Gesamtviroidgehalts einer Zelle in dem einer Isolierung nicht zugänglichen Cytoplasma befinden. Die in den Chloroplasten nachgewiesenen 1-2 Kopien müssen allerdings wohl als Verunreinigung angesehen werden, so daß in vivo auf ein völliges Fehlen von Viroid in diesen Organellen geschlossen werden kann.

In Wurzeln und Stengeln infizierter Pflanzen wurden zwar auch relativ hohe Konzentrationen an Viroiden nachgewiesen (Colpan et al., 1983), es ist jedoch keinesfalls klar, ob hier ebenfalls innerhalb der Zellen oder gar Zellkerne eine Akkumulation vorliegt.

Die mögliche Bedeutung der Viroid-Kopienzahlen (Abb. 37) wird erst im Vergleich mit anderen Molekülen, die ebenfalls im Zellkern lokalisiert sind, deutlich. So befinden sich, natürlich abhängig vom Aktivitätszustand der Zelle, $1 \cdot 10^7$-$1 \cdot 10^8$ Histone, etwa 40 000 Moleküle Polymerase I und II, ungefähr 20 000 Moleküle Polymerase III und z.B. 10^4-10^6 snRNAs in einem Zellkern (Alberts et al., 1983). Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß sich diese Zahlen auf Animalzellen beziehen.

Aus den mikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Tomatenzellkerne einen mittleren Durchmesser von 4-5 µm besitzen. Damit beträgt die Viroidkonzentration in den Zellkernen stark infizierter Pflanzen 10^{-7} M (Abb. 38). Die Dissoziationskonstante verschiedener Protein-Nukleinsäure-Komplexe, z.B. zwischen Nukleinsäuren und Polymerasen (z.B. Haseth et al.,

VERTEILUNG DER VIROIDE IN PFLANZENZELLEN

Zellkerne:	200 - 10 000 Viroide (je nach Fortschritt der Infektion)
Lysierte Zellkerne:	alle Viroide cosedimentieren mit Chromatingerüst
Chloroplasten:	1 - 2 Viroide (?)
ganze Zellen:	200 - 10 000 Viroide

Abb. 37: Zelluläre Verteilung der Viroide

1978) oder DNA und Histonen (z.B. Stein, 1979), würde eine Komplexbildung in diesem oder sogar einem noch geringeren Konzentrationsbereich sicherstellen. Viroide könnten aufgrund dieser Rechnung also durchaus mit Proteinen im Zellkern assoziiert vorliegen.

Einschränkend muß allerdings betont werden, daß die Konzentrationen nur für frei z.B. im Zellkern gelöste Viroide gelten. Liegt die Viroid-RNA aber komplexiert vor, so ist die freie Konzentration sehr viel niedriger.

Der erste Hinweis darauf, daß Viroide innerhalb der Zellkerne nicht frei gelöst vorliegen, kam aus einer Kosedimentation der Viroid-RNA mit dem Chromatingerüst lysierter Kerne bei der Chloroplastenisolierung. Allerdings befanden sich in diesem Sediment neben Zellverunreinigungen noch andere Kernbestandteile. Deutlich wurde hier aber bereits, daß die Viroide offensichtlich gebunden vorliegen, da sie aus lysierten Zellkernen nicht einfach

ins Medium freigesetzt werden.

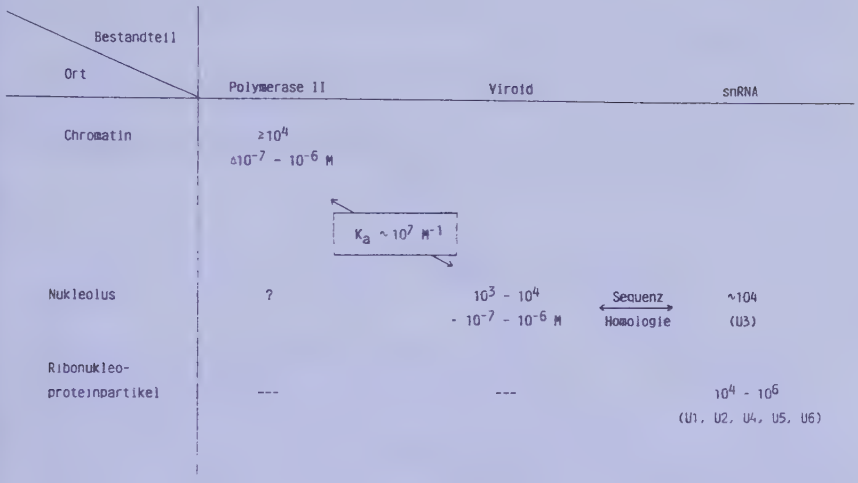

Abb. 38: Verteilung der Kopienzahl und Konzentration der Viroide sowie möglicher wechselwirkender Moleküle in der Zelle. Die molare Viroidkonzentration bezieht sich auf den Zellkern, sie ist im Nukleolus noch höher

Für eine makromolekulare Assoziation sprechen auch die Rekonstitutionsexperimente, die an gesunden Zellkernen mit Viroid durchgeführt wurden. Zu Beginn des Experiments kamen auf einen Zellkern 25 000 Viroid-Moleküle. Nach 10 min befanden sich im Durchschnitt bereits 3000 innerhalb des Kerns, der die Viroide geradezu anzuziehen scheint. Diese Eigenschaft wird noch deutlicher, wenn man nicht die absoluten Zahlen betrachtet. Die Ausgangskonzentration an Viroid-RNA betrug $2 \cdot 10^{-9}$ M. 8 min später lag die Konzentration in den Zellkernen bereits bei $1 \cdot 10^{-7}$ M. Dieser Gradient wird noch wesentlich steiler, wenn man berücksichtigt, daß bei Erreichen der Maximalkonzentration nach 20 min außerhalb der Zellkerne nicht etwa die Differenz von 25 000 - 5000 Viroid-RNAs nachgewiesen werden konnte, sondern praktisch keine. Offensichtlich waren die frei in Lösung befindlichen Viroide abgebaut worden. Die einfachste Erklärung dieser Aufkonzentrierung in den Zell-

kernen um den Faktor 100, ohne einen aktiven Transportmechanismus zu fordern, beruht in der Annahme, daß die Viroide sofort gebunden werden. Das würde bedeuten, daß die Konzentration an freien Viroiden im Zellkern immer nahe Null wäre und damit ein passiver Transport entlang eines Konzentrationsgradienten möglich wäre.

Ob es sich bei der in diesem Experiment erreichten Maximalkonzentration von 5000 Viroiden pro Zellkern wirklich um die Grenze handelt - in stark infiziertem Gewebe liegen die Zahlen ebenfalls in dieser Größenordnung - , muß in Folgeexperimenten überprüft werden.

6.3. Viroide sind mit der Nukleoli-Fraktion assoziiert

Die Fraktionierung der beschallten Zellkerne ergab, daß die Viroide nahezu quantitativ mit der Nukleoli-Fraktion sedimentieren (Abb. 39). Daraus kann eigentlich nur geschlossen werden, daß auch in vivo die Viroide mit den Nukleoli assoziiert vorliegen. Die Nukleoli sind bekanntlich keine membranumschlossenen Organellen. Ihre Struktur ist als Nukleinsäure-Protein-Aggregat zu verstehen, in dem auf engstem Raum rDNA Gene in Tandem-Anordnung in hoher Kopienzahl mit einer sehr hohen Transkriptionsrate von der Polymerase I abgelesen werden. Die entstehenden rRNAs werden sofort mit ribosomalen Proteinen zu den Ribosomen zusammengesetzt. Eine Assoziation der Nukleoli mit den Viroiden wurde bisher noch nicht beschrieben und widerlegt frühere Vermutungen über eine überwiegende Assoziation der Viroid-RNA mit dem Chromatin (z.B. Sänger, 1972; Diener, 1979a).

Die Viroide können mit Ionenstärken ab 400 mM aus den Nukleoli freigesetzt werden, ein typischer Wert für das Lösen von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen. So dissoziieren z.B. die Nicht-Histon-Proteine HMG 14 und HMG 17 bei Ionenstärken von 350-400 mM NaCl von der DNA ab (Weisbrod et al., 1980). Trotzdem kann zunächst nicht ausgeschlossen werden, daß die Viroide im Nukleolus nicht ionisch gebunden, sondern in diesem sehr dichten Netzwerk lediglich sterisch in Form eines Einschlußkomplexes festgehalten werden. Inzwischen wurden allerdings in unserem Labor "Blotting"-Experimente durchgeführt, die die These einer Protein-Viroid Assoziation unterstützen (Wolff, 1984).

Fraktionierung der beschallten Zellkerne

(nach T. Pederson)

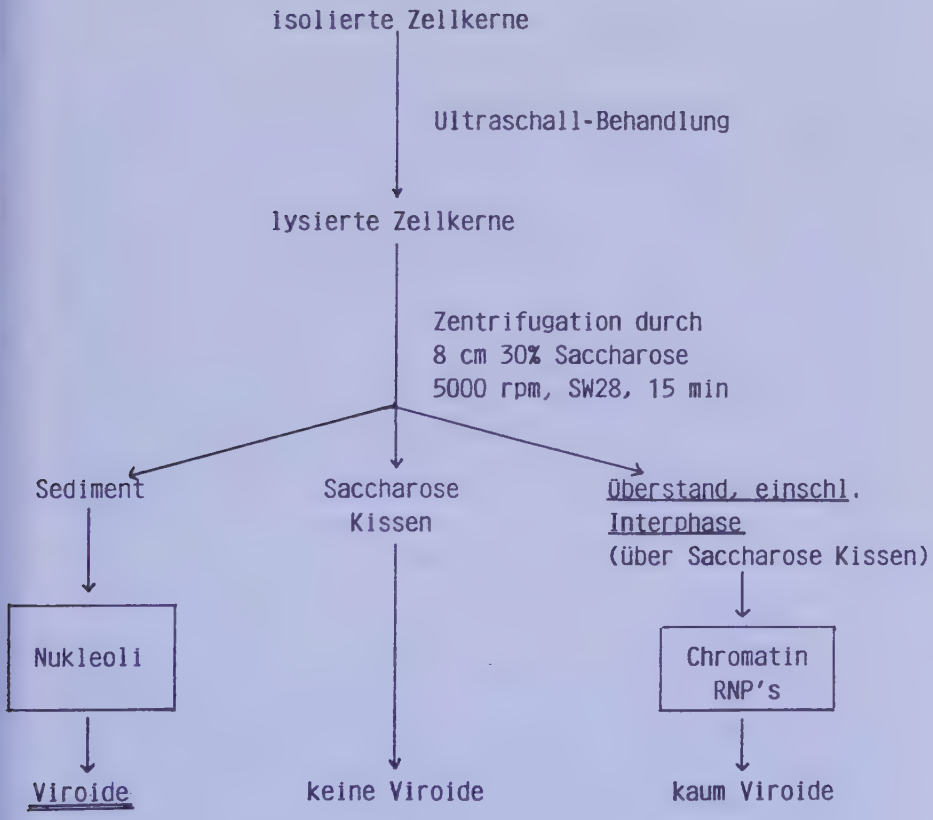

Abb. 39: Verteilung der Viroide auf die verschiedenen Fraktionen des Zellkerns

6.4. Funktionshypothese von Viroiden

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind primär strukturelle Aussagen zum in vivo Verhalten der Viroide. Es soll jetzt jedoch auch diskutiert werden, inwieweit Folgerungen für Infektionsmechanismus, Replikation, Pathogenese und Ursprung der Viroid-RNAs zu ziehen sind.

6.4.1. Infektionsmechanismus

Wie aus den Rekonstitutionsexperimenten hervorgeht, stellt die Aufnahme der Viroide in die Zellkerne keine Schwierigkeit dar, sofern sie sich erst einmal im Cytoplasma befinden. Es besteht dabei zur Zeit keine Veranlassung, einen aktiven Transport durch die Kernmembran zu fordern. Wird die Viroid-RNA im Zellkern, bzw. Nukleolus sofort gebunden, d.h. die freie Konzentration an Viroid ist praktisch Null, so kann die Aufnahme entlang eines Konzentrationsgradienten passiv erfolgen. Die Verteilung der Viroid-RNA über die Pflanze stellt auch keine Schwierigkeit dar, da die Zellen untereinander über die Plasmodesmen verbunden sind. Die Infektion der Pflanze selbst erfolgt durch Viroid-Übertragung von infiziertem Gewebe bei Verletzungen z.B. durch gärtnerische Maßnahmen wie Veredeln, Beschneiden, Ernten, aber auch über Insekten (De Bokx und Piron, 1981; Lee und Sänger, 1982).

6.4.2. Replikation

Wie aus unabhängigen Experimenten verschiedener Arbeitsgruppen (Grill und Semancik, 1978; Branch et al., 1981; Rohde und Sänger, 1981; Branch und Robertson, 1984) folgt, werden Viroide in vivo über oligomere (-) RNA-Zwischenformen repliziert. Viroid-spezifische DNA Sequenzen in der Wirtspflanze sind dagegen nicht nachweisbar (Branch und Dickson, 1980; Zaitlin et al., 1980; Branch et al., 1981; Hadidi et al., 1981; Rohde und Sänger, 1981). Damit bleiben als mögliche Kandidaten für die Replikation der Viroide zwei Klassen RNA-synthetisierender Enzyme, die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen I, II und III (Duda, 1976) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Fraenkel-Conrat, 1979).

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase I transkribiert die ribosomalen DNA

Gene. Da sie im Nukleolus lokalisiert ist (Roeder und Rutter, 1969; Jacob et al., 1970), bietet sie sich als Viroid-replizierendes Enzym an, zumal gezeigt werden konnte, daß sie in vitro Viroid-RNA transkribiert (Sänger, persönliche Mitteilung).

Inhibierungsexperimente mit $1 \cdot 10^{-8}$ M α-Amanitin an Tomaten-Protoplasten weisen auf eine zumindest indirekte Beteiligung der RNA-Polymerase II an der in vivo Replikation der Viroide hin (Mühlbach und Sänger, 1979; Flores und Semancik, 1982). Das Pilzgift hemmt in diesen Konzentrationen spezifisch nur diese Polymerase. In Transkriptionsuntersuchungen mit der RNA-Polymerase II, die aus Weizenkeimen und Tomatenpflanzen isoliert worden war, konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym auch in vitro spezifisch minus Viroid-RNA in voller Länge synthetisiert (Rackwitz et al., 1981). Die Bindekonstante von $1 \cdot 10^{7}$ M^{-1} (Riesner et al., 1983) zusammen mit den intramolekularen Konzentrationen an RNA-Polymerase II und Viroid würden eine Komplexbildung der beiden Moleküle ermöglichen. Allerdings ist dieses Enzym, das neben sämtlichen mRNA Vorläufer-Molekülen auch die kleinen Kern-RNAs U1-U6 synthetisiert (Busch et al., 1982), im Nukleoplasma lokalisiert (Roeder und Rutter, 1969; Jacob et al., 1970).

Die RNA-Polymerase III synthetisiert die ribosomale 5S RNA und tRNAs (Weinmann und Roeder, 1974) sowie die kleinen "uncapped" Kern-RNAs. Sie ist ebenfalls im Nukleoplasma (Roeder und Rutter, 1969; Schwartz et al., 1974) aktiv, und nicht im Nukleolus. Auch für dieses Enzym liegen Daten vor, daß es in vitro Viroid synthetisiert (Sänger, persönliche Mitteilung).

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase schließlich, ein wahrscheinlich cytoplasmatisches Enzym, dessen biologische Rolle im Metabolismus der Pflanzen noch weitgehend unbekannt ist, transkribiert ebenfalls Viroid in vitro (Boege et al., 1982). Die α-Amanitin-Inhibierungsexperimente sprechen allerdings nicht für eine Beteiligung dieses Enzyms an der in vivo Viroid-Replikation.

Abschließend läßt sich sagen, daß die meisten der zur Zeit vorliegenden Ergebnisse für eine Beteiligung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II an der Replikation der Viroide in den Pflanzen sprechen. Allerdings ist dieses Enzym in den Zellen nicht dort lokalisiert, wo der bei weitem größte Teil der Viroide nachgewiesen werden kann, nämlich in den Zellkernen. Abb. 38 faßt diese Daten zusammen.

Die Tatsache, daß die Viroide zum Großteil im Nukleolus lokalisiert sind, muß allerdings nicht notwendigerweise bedeuten, daß sie dort auch synthetisiert werden. Möglicherweise liegt hier ein ähnlicher Mechanismus

vor wie bei der Kern-RNA U3, die im Nukleoplasma synthetisiert wird und später erst in den Nukleolus diffundiert oder transportiert wird.

6.4.3. Pathogenese der Viroide

Die in der Literatur mehrmals beschriebene Sequenz-Homologie zwischen U1 RNA und Viroid-RNA führte zu der Hypothese, Viroide könnten mit dem RNA-Splicing interferieren und so die Krankheit verursachen (Dickson, 1981; Diener, 1981a,b; Diener, 1982; Gross et al., 1982). Das Splicing mit einer Beteiligung von U1 RNA läuft allerdings nicht im Nukleolus ab, sondern höchstwahrscheinlich in den RNPs (Lerner et al., 1980). Da in dieser Fraktion bei uns keine signifikanten Mengen an Viroid nachgewiesen werden konnten, scheint diese Hypothese zumindest fraglich. Aufgrund des eben erwähnten Befundes, daß U3 im Nukleolus an 28S RNA gebunden vorliegt, lag ein Vergleich der Sequenzen von PSTV- RNA mit U3 RNA nahe. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, daß die U3-Sequenz von Molekülen stammt, die aus Novikoff Hepatoma Zellen isoliert wurden (Reddy et al., 1979). Entsprechende Sequenzen pflanzlichen Ursprungs liegen noch nicht vor. Es ist jedoch bekannt, daß diese Moleküle hoch konservativ sind (Bralant et al., 1980). Aus den Sequenzhomologien zwischen PSTV- und U3 RNA - in Abb. 40 die umrandeten Gebiete - Schlüsse auf den Pathogenese-Mechanismus zu ziehen, scheint beim derzeitigen Stand der Kenntnisse allerdings verfrüht.

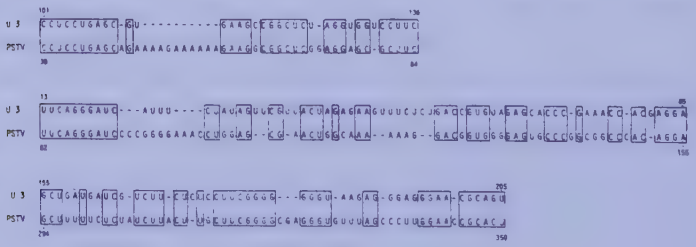

Abb. 40: Sequenz-Homologie zwischen PSTV-RNA (Gross et al., 1978) und RNA U3 aus Novikoff Hepatoma Zellen (Reddy et al., 1979)

6.4.4. Ursprung der Viroide

Wenn auch für eine mögliche Erklärung der Pathogenese aufgrund der zellulären Organisation eigentlich nur die U3 RNA in Frage kommt, so existieren doch erstaunlich viele Sequenz-Homologien zwischen Viroiden und den snRNAs allgemein. Besonders auffallend ist dabei die Übereinstimmung zwischen dem Bereich, der in allen Viroiden außer ASBV (**a**vocado **s**un **b**lotch viroid) konservativ ist, und dem Bereich der U1 RNA, der am Splicing-Prozeß beteiligt sein soll. Viroid-RNAs könnten demnach verselbständigte snRNAs sein (Diener, 1974; Diener 1979 a,b). Eine andere Erklärung besteht darin, daß die Viroide ursprünglich während des Splicing Prozesses, an dem die U1 RNAs beteiligt sein sollen, als zirkularisierte Introns entstanden sein könnten (Roberts, 1978; Crick, 1979; Diener, 1979 a,b; Diener, 1981 a,b; Gross et al., 1982). Auf weitere Hypothesen zum Ursprung der Viroide, die die Sequenzhomologie zwischen Viroid- und snRNAs nicht diskutieren, soll nicht näher eingegangen werden.

6.5. Anwendungen der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Bereits seit einiger Zeit wird als eine der Ursachen des "Waldsterbens" eine Infektion, möglicherweise als Vorläufer oder als Folge von Umwelteinflüssen, diskutiert. Aber erst durch die zweidimensionale Gelelektrophorese ist es möglich geworden, erkrankte Bäume auf Viroid-Befall hin zu untersuchen. Dazu mußte aufgrund der sehr hohen Anteile an sekundären Pflanzenstoffen in den Nukleinsäureextrakten der Test modifiziert werden. Durch Umdrehen der Bedingungen, d.h. in der ersten Dimension wurden die Proben denaturierend statt nativ, in der zweiten nativ statt denaturierend elektrophoretisch aufgetrennt, gelang es, den störenden Hintergrund zu entfernen. Die Eigenschaft der Viroid-RNA, deutlich aus der Front der übrigen Nukleinsäuren herauszufallen, wurde dadurch nicht berührt. Mit der modifizierten zweidimensionalen Gelelektrophorese konnte deutlich gezeigt werden, daß mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die Erkrankung der Waldbäume nicht auf Viroid-Befall, also auf einzelsträngige zirkuläre RNA im Molekulargewichtsbereich zwischen 85 000 und 200 000, zurückgeführt werden kann. Der vom Gelsystem abgedeckte Bereich lag zwischen 25 000 und 10^6 Dalton, also wesentlich größer als der der bekannten Viroide. Ein "DNA-Viroid" als mögliches infektiöses Molekül kann zwar nicht ausgeschlossen werden, wurde

aber bisher in der Natur nie beobachtet. Allerdings wurden in allen kranken Baumproben von Kiefern, Fichten und Rotbuchen, unabhängig vom Alter und Standort der Bäume, zusätzliche RNA-Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 150 000 und 200 000 gefunden. Im Fall der erkrankten Kiefern konnte sogar eine Korrelation zwischen der Menge an zusätzlicher RNA und der Stärke der Symptome an den Nadeln der Bäume aufgestellt werden. Die größte experimentelle Schwierigkeit bestand darin, unzweifelhaft gesunde Bäume zu finden.

Zur Zeit kann allerdings zwischen zwei Möglichkeiten des Ursprungs der zusätzlichen krankheitsassoziierten RNAs nicht unterschieden werden. Zunächst können sie zu einem infektiösen Organismus gehören. Es könnte dann dessen Genom oder Teile oder Transkripte des Genoms sein. Dabei kann nicht entschieden werden, ob es sich um Bakterien, Viren, Mycoplasmen, "lineare Viroide" u.s.w. handelt. Es gibt mehrere Berichte von Viren und Rickettsien ähnlichen Organismen, die bei bestimmten Krankheiten in Tannen, Eichen und Lärchen nachgewiesen werden konnten (Nienhaus, 1975; Braun, 1978; Nienhaus, 1979). Bisher gelang es aber nicht, einen Zusammenhang zwischen diesen Ergebnissen und dem "Waldsterben" herzustellen. Eine andere Möglichkeit bestände darin, daß die zusätzlichen RNAs als Reaktion der Bäume auf eine Krankheit auftreten, also als Transkripte des eigenen Genoms. Die beobachtete Verschiebung der Banden bei erkrankten Buchen deutet in diese Richtung.

7. Zusammenfassung

Bei den Viroiden handelt es sich um ringförmige, einzelsträngige pathogene RNA-Moleküle vom Molekulargewicht 80 000-200 000. Ihre molekulare in vitro Struktur ist weitgehend bekannt. Viroidinfektionen stellen bei einer Reihe von Kulturpflanzen ein wirtschaftliches Problem dar.

Zum Verständnis der Replikation und Pathogenese der Viroid-RNA ist die Kenntnis ihrer zellulären Organisation im Wirtsorganismus eine der wesentlichen Voraussetzungen. In den letzten Jahren wurde die Vermutung geäußert, daß sie in den Zellkernen der befallenen Pflanzen lokalisiert sind. Ein echter Beweis fehlte jedoch, da bei diesen Untersuchungen aus präparationstechnischen Gründen immer nur von angereicherten Fraktionen ausgegangen wurde.

In dieser Arbeit wird eine Methode zur Isolierung von hochreinen Zellkernen aus dem Blattgewebe ausgewachsener Tomatenpflanzen entwickelt. Hierbei werden die Blätter mechanisch ohne Zusatz von Enzymen aufgeschlossen. In Differentialzentrifugationen werden die Zellkerne angereichert. Zur Lyse der Chloroplasten dient der Zusatz von 0.6% NP 40 in den Puffern. Die Hochreinigung der Zellkerne erfolgt in zwei Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugationen.

Zellkerne aus infiziertem Gewebe enthalten 200-10 000 Viroid-RNAs, abhängig vom Infektionsgrad der Pflanzen. Diese Zahlen stimmen sehr gut mit den Kopienzahlen pro Zelle überein, die man aus dem Viroidgehalt des gesamten Nukleinsäureextrakts von erkranktem Gewebe errechnen kann. Chloroplasten enthalten nur 1-2 Viroid-Moleküle, was als Verunreinigung interpretiert wird. Damit kann als gesichert gelten, daß der überwiegende Teil der in der Zelle befindlichen Viroide im Zellkern lokalisiert ist.

Die Zellkerne wurden aufgebrochen und Chromatin, Ribonukleoproteinpartikel und Nukleoli auf Viroidgehalt untersucht. Dabei wurde gefunden, daß der weitaus größte Teil der im Zellkern nachweisbaren Viroide im Nukleolus lokalisiert ist. Die Kopienzahlen betragen, abhängig von der Stärke der Infektion, wiederum 200-10 000. Die Aufnahme der Viroide in den Zellkern kann in in vitro Experimenten nachvollzogen werden. Viroid-RNA wird mit einer Zeitkonstante von 8 min in den Zellkern aufgenommen und baut dabei einen Konzentrationsgradienten von $2 \cdot 10^{-9}$ M in Lösung zu einer mittleren Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ M im Kern auf. Die mit steigender Ionenstärke abnehmende Assoziation der Viroide in den Nukleoli spricht für eine Komplexierung der

Viroid-RNA mit Proteinen. Hypothesen zur Replikation und Pathogenese, die die Lokalisation und Assoziation der Viroide berücksichtigen, werden diskutiert.

Der Nachweis der Viroide in den verschiedenen Fraktionen mit der Bestimmung der Kopienzahlen gelang erst durch die Entwicklung eines zweidimensionalen und bidirektionellen Gelelektrophoreseverfahrens, das die physikochemischen Eigenschaften der Viroid-RNA systematisch ausnutzt. Dabei ermöglicht die zweidimensionale Gelelektrophorese das Auffinden unbekannter zirkulärer RNA beliebiger Sequenz. Die bidirektionelle Gelelektrophorese kann gleichzeitig viele Proben auf ringförmige RNAs bekannter Größe hin überprüfen und so als quantitativer Routinetest eingesetzt werden. Der Vorteil beider Verfahren liegt darin, daß von sehr unreinen Nukleinsäureextrakten ausgegangen werden kann. Die Nachweisempfindlichkeit in Verbindung mit der Silberfärbung liegt für Viroid-RNA bei 80 pg.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde auch zur Analyse des Nukleinsäuremusters von gesunden und vom "Waldsterben" betroffenen Fichten, Kiefern und Rotbuchen eingesetzt. Dabei konnte zwar keine Viroid-RNA, dafür aber zusätzliche RNA-Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 150 000 und 200 000 nachgewiesen werden. Ob es sich hierbei um eine Reaktion der Bäume auf Umwelteinflüsse oder pathogene Organismen oder um infektiöse Fremd-Nukleinsäure handelt, muß noch überprüft werden.

8. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1983)
Molecular biology of the cell.
Garland Publishing, Inc., New York, London.

Bellamy, A.R. und Ralph, R.K. (1968)
Recovery and purification of nucleic acids by means of CTAB.
Meth. Enzymol. 12B,156-160.

Berger, S.L. und Birkenmeier, C.S. (1979)
Inhibition of intractable nucleases with ribonucleoside-vanadyl complexes: Isolation of messenger ribonucleic acid from resting lymphocytes.
Biochemistry 18, 5143-5149.

Blaschek, W, Hess, D. und Hoffmann, F. (1974)
Transcription in nuclei prepared from isolated protoplasts of Nicotiana and Petunia.
Z. Pflanzenphysiol. 72, 262-271.

Boege, F., Rohde, W. und Sänger, H.L. (1982)
In vitro transcription of viroid RNA into full length copies by RNA-dependent RNA polymerase from healthy tomato leaf tissue.
Biosci. Rep. 2, 185-194.

Branch, A.D. und Dickson, E. (1980)
Tomato DNA contains no detectable regions complementary to PSTV as analysed by Southern hybridization.
Virology 104, 10-16.

Branch, A.D., Robertson, H.D. und Dickson, E. (1981)
Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6381-6385.

Branch, A. D. und Robertson, H.D. (1984)
A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's.
Science 223, 450-455.

Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.-P., Lazar, E., Gallinaro, H., Jakob, M., Sri-Widada, J. und Jeanteur, P. (1980)
Nucleotide sequences of nuclear U1A RNAs from chicken, rat and man.
Nucl. Acids Res. 8, 4143-4154.

Braun, H.J. und Fink, S. (1978)
Zur epidemischen Erkrankung der Weißtanne Abies alba Mill. ("Tannensterben").
Allg. Forst- u. J. Ztg. 149, 184-194.

Brown, F. und Martin, S.J. (1965)
A new model for virus ribonucleic acid replication.
Nature (London) 208, 861-863.

Brüggemann, W. (1982)
Isolierung von Viroiden und deren Verteilung auf Blätter, Stengel und Wurzeln von Tomate (Lycopersicon esculentum).
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf 1982.

Burckhardt, J. und Birnstiel, M.L. (1978)
Analysis of histone messenger RNA of Drosophila melanogaster by two-dimensional gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 118, 61-79.

Busch, A., Reddy, R., Rothblum, L. und Choi, Y.C. (1982)
Sn RNAs, Sn RNPs, and RNA processing.
Annu. Rev. Biochem. 51, 617-654.

Camacho Henriquez, A. und Sänger, H.L. (1982a)
Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after infection with a viroid, two viruses and a fungus and partial purification of the "pathogenesis-related" protein p 14.
Arch. Virol. 74, 181-196.

Camacho Henriquez, A. und Sänger, H.L. (1982b)
Gelelectrophoretic analysis of phenol-extractable leaf proteins from different viroid/host combinations.
Arch. Virol. 74, 167-180.

Capesius, J. und Meyer, Y. (1977)
Isolation of nuclei from protoplasts of orchids.
Eur. J. Cell Biol. 15, 485-490.

Chen, Y.M., Lin, C.Y., Chang, H., Guilfoyle, T.J., und Key, J.L. (1975)
Isolation and properties of nuclei from control and auxin-treated soybean hypocotyl.
Plant Physiol. 56, 78-82.

Colpan, M., Schumacher, J., Brüggemann, W., Sänger, H.L. und Riesner, D. (1983)
Large-scale purification of viroid RNA using Cs_2SO_4 gradient centrifugation and high performance liquid chromatography.
Anal. Biochem. 131, 257-265.

Crick, F. (1979)
Split genes and RNA splicing.
Science 204, 264-271.

D'Alessio, G. und Trim, A.R. (1968)
A method for the isolation of nuclei from leaves
J. Exp. Bot. 19, 831-839.

Davies, J.W., Kaesberg, P. und Diener, T.O. (1974)
Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis.
Virology 61, 281-286.

De Bokx, J.A. und Piron, P.G.M. (1981)
Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids.
Neth. J. Plant Pathol. 87, 31-34.

de Haseth, P.L., Lohmann, T.M., Burgers, R.R. und Record, M.T., Jr. (1978)
Nonspecific interactions of Escherichia coli RNA polymerase with native and denatured DNA: Differences in the binding behaviour of core and holoenzyme.
Biochemistry (Wash.) 17, 1612-1622.

DeWachter, R. und Fiers, W. (1982)
In: Gel electrophoresis of nucleic acids, (Rickwood, J. und Hames, B.D., eds) IRL-Press, Oxford.

Dickson, E. und Robertson, H.D. (1976)
Potential regulatory roles for RNA in cellular development.
Cancer Res. 36, 3387-3393.

Dickson, E. (1979)
Viroids: Infectious RNA in plants.
In: Nucleic acids in plants, Band II (Hall, T.C. and Davies, J.W., eds.), CRC Press, Boca Raton, 1979.

Dickson, E. (1981)
A model for the involvement of viroids in RNA splicing.
Virology 115, 216-221.

Diener, T.O. (1971)
Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or in situ.
Virology 43, 75-89.

Diener, T.O. (1974)
Viroids: The small unknown agents of infectious disease.
Ann. Rev. Microbiol. 28, 23-39.

Diener, T.O., Hadidi, A. und Owens, R.A. (1977)
Methods for studying viroids.
In: Koprowski, H., Maramosch, K. (eds.), Vol 6. Academic Press, London, New York.

Diener, T.O. und Hadidi,A. (1977)
Viroids.
In: Comprehensive Virology, Band XI, (Fraenkel-Conrad, H. und Wagner, R.R. Hrsg.), Plenum, New York, 1977.

Diener, T.O. (1978)
Are viroids autoinducing regulatory RNA's.
In: Perssistant Viruses, Academic Press, London, New York.

Diener, T.O. (1979a)
Viroids: Structure and function.
Science 205, 859-866.

Diener, T.O. (1979b)
Viroid and viroid diseases.
Wiley and Sons, New York.

Diener, T.O. (1981a)
Are viroids escaped introns?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5014-5015.

Diener, T.O. (1981b)
Viroids: abnormal products of plant-metabolism.
Annu. Rev. Plant Physiol. 32, 313-325.

Diener, T.O. (1982)
Viroids - minimal biological systems.
Bioscience 32, 38-44.

Duda, C.T. (1976)
Plant RNA polymerases.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 119-132.

Fischer, St.G. und Lerman, L.S. (1979)
Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis.
Cell 16, 191-200.

Flores, R. und Semancik, J.S. (1982)
Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6285-6288.

Fraenkel-Conrath, H. (1979)
RNA-dependent RNA polymerase of plants.
Trends Biochem. Sci. 4, 184-186.

Granell, A., Flores, R. und Conejero, V. (1983)
Fractionation with ethanol of nucleic acids from viroid-infected plants.
Anal. Biochem. 134, 479-482.

Grill, L.K. und Semancik, J.S. (1978)
RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected Gynura aurantiaca.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 896-900.

Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. und Sänger, H.L. (1978)
Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid.
Nature (London) 273, 203-208.

Gross, H.J. und Riesner, D. (1980)
Viroids: A class of subviral pathogens.
Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.) 19, 231-243.

Gross, H.J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Alberty, H., Lossow, C.H., Ramm, K. und Sänger, H.L. (1982)
Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid.
Eur. J. Biochem. 121, 249-257.

Hadidi, A., Cress, D.E. und Diener, T.O. (1981)
Nuclear DNA from uninfected or potato spindle tuber viroid-infected tomato plants contains no detectable sequences complementary to cloned double-stranded viroid cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6932-6935.

Hall., T.C., Wepprich, R.K., Davies, J.W., Weathers, L.G. und Semancik, J.S. (1974)
Functional distinctions between the ribonucleic acids from citrus exocortis viroid and plant viruses: Cell free translation and aminoacylation reactions.
Virology 61, 486-492.

Hamilton, R.H., Künsch, U. und Temperli, A. (1972)
Simple rapid procedures for isolation of tobacco leaf nuclei.
Anal. Biochem. 49, 48-57.

Haseloff, J., Mohamed, N.A. und Symons, R.H. (1982)
Viroid RNAs of the cadang-cadang disease of coconuts.
Nature (London) 299, 316.

Henco, K., Riesner, D. und Sänger, H.L. (1977)
Conformation of viroids.
Nucl. Acids Res. 4, 177-194.

Henco, K. (1979)
Viroide: Eine Klasse von Ribonukleinsäuren mit einem aussergewöhnlichen strukturellen und dynamischen Prinzip.
Dissertation, TH Hannover, 1979.

Henco, K., Sänger, H.L. und Riesner, D. (1979)
Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods.
Nucl. Acids Res. 6, 3041-3059.

Herrmann, R.G. (1982)
The preparation of circular DNA from plastids.
In: Edelman, M., Hallick, R.B. und Chua, N.H., Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier, 259-280.

Hsu, M. und Coco-Prados, M. (1979)
Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eucaryotic cells.
Nature (London) 280, 339-340.

Imperial, J.S., Rodriguez, M.J.B. und Randles, J.W. (1982)
Variation in the viroid-like RNA associated with cadang-cadang disease: Evidence for an increase in molecular weight with disease progress.
J. Gen. Virol. 56, 77-86.

Jacob, S.T., Sajdel, E.M. und Munro, H.N. (1970)
Different responses of soluble whole nuclear RNA polymerase and soluble nucleolar RNA polymerase to divalent cations and to inhibition by α-amanitin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 765-770.

Jakobi, G. (1974)
Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle.
Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 15-33.

Jones, A.S. (1963)
Use of alkyltrimethylammonium bromides for the isolation of ribo- and deoxyribonucleic acids.
Nature (London) 199, 280-282.

Kandler, O. (1983)
Waldsterben: Emission- oder Epidemic-Hypothese?
Naturwissenschaftliche Rundschau 36, 488-490.

Kratz, U. (1981)
Viroide: Nachweis seltener Nukleotide durch chemische Spaltung und physikalische Eigenschaften.
Dissertation, TH Darmstadt.

Kuehl, L. (1964)
Isolation of plant nuclei.
Z. Naturf. 19b, 831-839.

Lee, J. und Sänger, H.L. (1982)
Transmission of potato spindle tuber viroid (PSTV) by the peach aphid Myzus persicae.
In Vorbereitung.

Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. und Steitz, J.A. (1980)
Are snRNPs involved in splicing?
Nature (London) 283, 220-224.

Lörz, H. und Potrykus, J. (1978)
Investigations on the transfer of isolated nuclei into plant protoplasts.
Theor. Appl. Genet. 53, 251-256.

Luthe, D.S., Quatrano, R.S. (1980)
Transcription in isolated wheat nuclei.
Plant Physiol. 65, 305-308.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Matthews, R.E.F. (1978)
Are viroids negative strand viruses?
Nature 276, 850

Mennes, A.M., Vogt, E.und Libbenga, K.R. (1977)
The isolation of nuclei from cultured tobacco pith explants.
Plant Science Letters 8, 171-177.

Morris, T.J. und Smith, E.M. (1979)
Potato spindle tuber disease: Procedure for the detection of viroid-RNA and certification of disease-free potato tubers.
Phytopathogy 67, 145-150.

Mühlbach, H.P. und Sänger, H.L. (1977)
Multiplication of cucumber pale fruit viroid in inoculated tomato leaf protoplasts.
J. Gen. Virol. 35, 377-386.

Mühlbach, H.P. und Sänger, H.L. (1979)
Viroid replication is inhibited by α-amanitin.
Nature (London) 278,185-188.

Niblett, C.L., Dickson, E., Horst, R.K. und Romaine, C.F. (1980)
Additional hosts and an efficient purification procedure for four viroids.
Phytopathology 70, 610-615.

Nienhaus, F. (1975)
Viren und virusverdächtige Erkrankungen in Eichen (Quercus robur und Quercus sessiliflora).
Z. PflKrankh. PflSchutz 82, 739-749.

Nienhaus, F. (1979)
Lärchen-Degeneration durch Rickettsien-ähnliche Bakterien.
Allg. ForstZ. 6, 130-132.

Ohno, T., Akiya, J., Higuchi, M., Okada, Y., Yoshikawa, N., Takahashi, T. und Hashimoto, J. (1982)
Purification and characterization of hop stunt viroid.
Virology 118, 54-63.

Owens, R.A. und Diener, T.O. (1982)
RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 113-117.

Palukaitis, P. und Symons, R.H. (1980)
Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid.
J. Gen. Virol. 46, 477-489.

Peacock, A.C. und Dingmann, C.W. (1968)
Analytical study on nuclear ribonucleic acid using polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochem. 7, 659-668.

Pederson, T. (1974)
Gene activation in eukaryotes: Are nucleic acidic proteins the cause or the effect?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 617-621.

Pfannenstiel, M.A., Slack, S.A. und Lane, L.C. (1980)
Sensitive and rapid diagnosis of PSTV by nucleic acid hybridization.
Phytopathology 71, 770-774.

Rackwitz, H.R., Rohde, W. und Sänger, H.L. (1981)
DNA-dependent RNA polymerase-II of plant-origin transcribes viroid RNA into full length copies.
Nature (London) 291, 297-301.

Randles, J.W. (1975)
Association of two RNA species with cadang-cadang disease of coconut palm.
Phytopathology 65, 163-167.

Randles, J.W., Rillo, E.P. und Diener, T.O. (1976)
The viroid-like structure and cellular location of anomalous RNA associated with cadang-cadang disease.
Virology 74, 128-139.

Randles, J.W., Steger, G. und Riesner, D. (1982)
Structural transitions in viroid-like RNA associated with cadang cadang disease, velvet tobacco mottle virus and solanum nodiflorum mottle virus.
Nucl. Acids Res. 10, 5569-5586.

Reanny, D.C. (1975)
A regulatory role for viral RNA in eucaryotes.
J. Theor. Biol. 49, 461-492.

Reddy, R., Henning, D. und Busch, H. (1979)
Nucleotide sequence of nucleolar U3B RNA.
J. Biol. Chem. 254, 11097-11105.

Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A.K., Gross, H.J., Domdey, H. und Sänger, H.L. (1979)
Structure and structure formation of viroids.
J. Mol. Biol. 133, 85-115.

Riesner, D., Steger, G., Schumacher, J., Gross, H.J., Randles, J.W. und Sänger, H.L. (1983)
Structure and function of viroids.
Biophys. Struct. Mech. 9, 145-170.

Roberts, R.J. (1978)
Intervening sequences excised in vitro.
Nature (London) 274, 530.

Roberts, R.J. (1980)
Small RNAs and splicing.
Nature (London) 283, 132-133.

Robertson, H.D. und Dickson, E. (1974)
RNA processing and the control of gene expression.
In: Process. Brookhaven Symp. Biol. 26, 240-266.

Roeder, R.G. und Rutter, W.J. (1969)
Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eucaryotic organisms.
Nature (London) 224, 234-237.

Rohde, W. und Sänger, H.L. (1981)
Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by northern blot hybridization.
Biosci. Rep. 1, 327-336.

Rokohl, U. (1982)
Spezifität der Wechselwirkung von Viroiden mit Farbstoffliganden.
Dissertation, TH Darmstadt.

Romeis, B. (1968)
Mikroskopische Technik.
16. Auflage, R. Oldenburg, München, Wien.

Salzwedel, J. (1983)
Waldschäden und Luftverunreinigungen.
Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart, Mainz.

Sammons, D.W., Adams, L.D. und Nishizawa, E.E. (1981)
Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 2, 135-141.

Sänger, H.L. (1972)
An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the exocortis disease of citrus.
Adv. Biosci. 8, 103-116.

Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. und Kleinschmidt, A.K. (1976)
Viroids are single-stranded, covalently closed circular RNA molecules existing a highly basepaired rod-like structures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3852-3856.

Sänger, H.L., Ramm, K., Domdey, H., Gross, H.J., Henco, K. und Riesner, D. (1979)
Conversion of circular viroid molecules to linear strands.
FEBS Lett. 99, 117-122.

Sänger, H.L. (1982)
Biology, structure, functions and possible origin of viroids.
In: Encyclopedia of Plant Physiology (Parthier, B. and Boulter, D., eds.)
New Series, Vol. 14B, 368-454, Springer Verlag Berlin/Heidelberg.

Schumacher, J. (1979)
Isolierung von Zellkernen aus Blättern von Tomatenpflanzen.
Diplomarbeit, TH Darmstadt.

Schwartz, L.B., Sklar, V.E.F., Jaehning, J.A., Weinmann, R. und Roeder, R.G. (1974)
Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma MOPC 315.
J. Biol. Chem. 249, 5889-5897.

Semancik, J.S. und Weathers, L.G. (1972)
Exocortis virus: An infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties.
Virology 47, 456-460.

Semancik, J.S. und Weathers, L.G. (1972)
Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants.
Nature (New Biol.) 237, 242-244.

Semancik, J.S., Morris, T.J., Weathers, L.G., Rodorf, B.F. und Kearns, D.R. (1975)
Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease.
Virology 63, 160-167.

Semancik, J.S., Tsuruda, D., Zaner, L., Geelen, J.L.M.C. und Weathers, J.G. (1976)
Exocortis disease: Subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA.
Virology 69, 669-676.

Semancik, J.S., Conjero, V. und Gerhart, J. (1977)
Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in Xenopus laevis oocytes following addition of viroid RNA.
Virology 80, 218-221.

Semancik, J.S. und Szychowski, J. (1983)
Enhanced detection of viroid-RNA after selective divalent cation fractionation.
Anal. Biochem. 135, 275-279.

Sharp, P.A. (1981)
Speculations on RNA splicing.
Cell 23, 643-646.

Singh, A. und Sänger, H.L. (1976)
Chromatographic behaviour of the viroids of the exocortis disease of citrus and of the spindle tuber disease of potato.
Phytopath. Z. 87, 143-160.

Stein, A. (1979)
DNA folding by histones: The kinetics of chromatin core particle reassembly and the interaction of nucleosomes with histones.
J. Mol. Biol. 130, 103-104.

Stout, J.T. und Hurley, C.K. (1977)
Isolation of nuclei and preparation of chromatin from plant tissues.
Methods Cell Biol. 16, 87-96.

Takahashi, T. und Diener, T.O. (1975)
Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infectious leaves.
Virology 64, 106-114.

Takahashi, T., Yaguchi, S., Oikawa, S. und Kamita, N. (1982)
Subcellular location of hop stunt viroid.
Phytopathol. Z. 103, 285-293.

Tautvydas, K.J. (1971)
Mass isolation of pea nuclei.
Plant. Physiol. 47, 499-503.

Trapnell, B.C., Tolstoshev, P. und Crystal, R.G. (1980)
Secondary structures for the splicing junctions in eucaryotic and viral messenger RNA precursors.
Nucl. Acids Res. 8, 3659-3672.

Vigne, R. und Jordan, B.R. (1971)
Conformational analysis of RNA molecules by partial RNase digestion and two dimensional acrylamide gel electrophoresis: Application to E.coli 5 S RNA
Biochimie 53, 981-986.

Weinmann, R. und Roeder, R.G. (1974)
Role of DNA-dependent RNA polymerase III in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1790-1794.

Weisbrod, S., Groudine, M. und Weintraub, H. (1980)
Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes.
Cell 19, 289-301.

Wild, U., Ramm, K., Sänger, H.L. und Riesner, D. (1980)
Loops in viroids.
Eur. J. Biochem. 103, 227-235.

Willmitzer, L. und Wagner, K.G. (1981)
The isolation of nuclei from tissue-cultured plant cells.
Exp. Cell Res. 135, 69-77.

Wolff, P. (1984)
Viroid-Protein Komplexe in vitro und in vivo.
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf 1984.

Zaitlin, M., Niblett, C.L., Dickson, E. und Goldberg, R.B. (1980)
Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization.
Virology 104, 1-9

Zelasny, B., Randles, J.W., Boccardo, G. und Imperial, J.S. (1982)
The viroid nature of the cadang-cadang disease of coconut palm.
Scientia Filipinas 2, 46-63.

Zieve, G.W. (1981)
Two groups of small stable RNAs.
Cell 25, 296-297.

Zieve, G. und Penman, Sh. (1981)
Subnuclear particles containing a small nuclear RNA and heterogeneous nuclear RNA.
J. Mol. Biol. 145, 501-523.

Lebenslauf

Name:	Jürgen Walter Schumacher
geb.:	19. 7.1953
Vater:	Helmut Schumacher
Mutter:	Thea Schumacher, geb. Schaly
Ehefrau:	Dr. Marion Schumacher, geb. Schmitt
Tochter:	Stephanie Schumacher

Schulbildung

1960-1964	Volksschule, Völklingen/Heidstock
1964-1972	Staatl. Realgymnasium, Völklingen
1972	Abitur
1972-1974	Bundeswehr

Studium

1974	Beginn des Biologiestudiums an der Technischen Hochschule Darmstadt
1976	Vordiplom
1978	Diplomhauptprüfung Biologie, Technische Hochschule Darmstadt
1978-1979	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt
seit 1980	Beginn der Dissertation bei Prof.Dr.D.Riesner am Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Technischen Hochschule Darmstadt
seit 1980	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf

Eidesstattliche Erklärung

Hierdurch erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, den 24. Mai 1984

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353